T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYARBAKIR KARPUZU SÜRME TİPİNDE (*Citrullus lanatus*) SOMATİK EMBRİYOGENESİS ÇALIŞMALARI

Cihat DEĞİRMENCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Şubat 2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve çalışmamın yürütülebilmesi için kurucusu olduğu Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarını tüm imkanlarıyla kullanımıma sunan ve bilgi ve deneyimleri yanında sabrını da benden hiç esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Vedat PİRİNÇ'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve önerileriyle katkı sunan sayın Prof. Dr. Ahmet ONAY ve Dr. Öğr. Üyesi Zafer AKTÜRK hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yararlandığım binoküler mikroskoplar için, sayın Prof. Dr. Erol BAYHAN ve Dr. Öğr. Üyesi Gül İMRİZ hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın istatistiki analizlerinin gerçekleştirilmesine büyük katkıları olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma BAŞDEMİR ve Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM hocalarıma, ve tezimin biçimsel olarak düzenlenmesinde katkılarından dolayı Doktora öğrencisi Ahmet İsmail ÖZKAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca manevi desteklerinden dolayı tüm bölüm hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Cihat DEĞİRMENCİ

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir. Proje Numarası: **ZİRAAT.19.007, 2019**.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR…… I

İÇİNDEKİLER……..... III

ÖZET……..... VI

ABSTRACT……..... VII

ÇİZELGE LİSTESİ……..... VIII

ŞEKİL LİSTESİ……..... X

KISALTMA VE SİMGELER…… XII

1. GİRİŞ……..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ....…… 9

2.1. Kabakgillerde (*Cucurbitaceae*) Yapılmış *İn vitro* Çalışmalar……..... 9

2.1.1. Karpuzda *İn vitro* Kültür Çalışmaları.....…….. 9

2.1.2. İlk Somatik Embriyogenesis Çalışmaları..... 16

2.1.3. Karpuzda Somatik Embriyogenesis Çalışmaları..... 17

2.1.4. *Cucurbitaceae* Familyasında Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları.... 19

3. MATERYAL ve YÖNTEM…… 29

3.1. Materyal……..... 29

3.1.1. Olgun Sürme Tipi Karpuz Tohumlarının Çimlendirilmesi..... 29

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri..... 30

3.2. Yöntem……..... 31

3.2.1. Sterilizasyon Teknikleri.....…….. 31

3.2.1.1. Cam Malzeme Ve Ekipmanlarının Sterilizasyonu …….. 31

3.2.1.2. Metal Malzeme ve Ekipmanlarının Sterilizasyonu…….. 31

3.2.1.3. Kağıt Malzemelerin Sterilizasyonu.....……..... 31

3.2.1.4. Kültür Kaplarının Sterilizasyonu.....……..... 31

3.2.1.5. Besi Ortamının Sterilizasyonu.....…….. 31

3.2.1.6. Tohumların Sterilizasyonu....……..... 32

3.2.2. Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları..... 32

3.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması..... 33
3.2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) Stok Çözeltilerinin Hazırlanması..... 34
3.2.5. Kallus ve Somatik ve Somatik Embriyogenesis Başlatma Çalışmaları..... 35
3.2.5.1. Deney I..... 35
3.2.5.2. Deney II..... 37
3.2.6. Embriyo Olgunlaştırma ve Çimlendirme..... 38
3.2.7. Aklimatizasyon İşlemleri..... 38
3.2.8. Çalışmada Yapılan Ölçüm ve Gözlemler..... 39
3.2.8.1. Deney I..... 39
3.2.8.2. Deney II..... 40
3.2.9. Verilerin Analizi..... 43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 45
4.1. Tohumların Sterlizasyonu..... 45
4.2. Deney I'de Yapılan Embriyogenisis Çalışmalar..... 46
4.2.1. Kallus ve Embriyogenik Kallus Oluşumu..... 46
4.2.2. Yaş Kallus Ağırlığı ve Kallus Çap Ölçümleri..... 50
4.3. Deney II'de Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları..... 52
4.3.1. Kallus Oluşumu..... 52
4.3.1.1. BAP – NAA Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna etkisi.. 54
4.3.1.2. BAP – 2,4-D Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna etkisi.. 56
4.3.1.3. TDZ – NAA Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna etkisi.. 58
4.3.1.4. TDZ – 2,4-D Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna etkisi.. 59
4.3.1.5. Kallus Oluşum Bulgularının Genel Değerlendirilmesi..... 60
4.3.2. Embriyogenik Kallus Oluşumu..... 62
4.3.3. Eksplant Başına Somatik Embriyo Sayısı (adet/kallus)..... 66
4.3.3.1. Embriyogenik Kallus ve Embriyo Oluşumu Genel Değerlendirme..... 70
4.3.4. Somatik Embriyoların Olgunlaşma, Çimlenme, Bitkiciklere Dönüşme ve Aklimatizasyon Oranları..... 71
4.3.5. Somatik Embriyolardan Gelişen Bitkiciklerin (Embling) Kök Uzunlukları..... 74
4.3.6. Somatik Embriyolardan Gelişen Bitkiciklerin (Embling) Sürgün Boyları..... 75

4.3.7. Aklimatize Edilen Somatik Embriyo Orijinli Bitkiciklerin (Embling) Sürgün Boyları..... 75

4.3.8. Tarlaya Aktarılan Bitkicikler (Embling)..... 76

5. SONUÇ VE ÖNERİLER..…..……..... 79

6. KAYNAKLAR……..... 83

ÖZGEÇMİŞ…….... 89

ÖZET

DİYARBAKIR KARPUZU SÜRME TİPİNDE (*Citrullus lanatus*) SOMATİK EMBRİYOGENESİS ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cihat DEĞİRMENCİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

2021

Bu çalışmada, Diyarbakır karpuzu Sürme tipinin somatik embriyogenesis yoluyla çoğaltılabilmesi için bir rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Deney I ve Deney II olmak üzere iki farklı deney yapılmıştır. Deney I'de Sürme'nin olgun tohumlarından *in vitro* olarak elde edilen 20 günlük fidelerin kotiledon kesitleri, TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l), NAA (0.5, 1.0, 1.5 mg/l) ve 2,4-D (0.5, 0.75, 1 mg/l) konsantrasyon ve kombinasyonları ile desteklenen MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamında, Deney II'de ise Sürme'nin olgun tohumlarından *in vitro* olarak elde edilen 5 günlük fidelerin kotiledon, hipokotil ve kotiledon çeneği, BAP (1.0, 2.0, 3.0 mg/l), TDZ(0.1, 0.25, 0.5 mg/l), NAA (0.05, 0.1, 0.5 mg/l) ve 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 mg/l) konsantrasyon ve kombinasyonları ile desteklenen MS besi ortamında kültür işlemi başlatılmıştır.

Deney I'de, TDZ + NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında %100 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Yalnız NAA içeren ortamların dışında, kallus oluşumu gözlemlenen tüm ortamlarda %100 oranında embriyogenik kallus oluşumu gözlenmiştir. Herbir eksplantta çok yüksek miktarlarda kallus oluşumu meydana gelmiştir. Ortalama her bir yaş kallus ağırlığının en düşüğü 820.1 mg ve en büyüğü ise 4184.25 mg olarak saptanmıştır.

Deney II'de, BAP + NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında %89-100, BAP + 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarında ise %61,27-100 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Embriyogenik kallus oranı bakımından BAP + NAA kombinasyonu %75-100, BAP + 2,4-D kombinasyonlarında ise %0.62-86.21 olarak saptanmıştır. Somatik embriyo oluşumu en çok BAP + NAA kombinasyonlarında saptanmıştır. En yüksek ortalama somatik embriyo sayısı 23.2 adet ile 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında saptanmıştır. Eksplant tipi bazında ise en yüksek somatik embriyo sayısı 62.6 adet ile kotiledon (3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA), 46.9 adet ile kotiledon çeneği (1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA) ve 11.3 adet ile hipokotilde (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA). Somatik embriyoların çimlenme oranları sırasıyla; %52.7 ile 1 mg/l IAA, %35.5 ile kontrol (BBDsiz) ve %31.8 ile 1 mg/l Kin içeren MS olgunlaştırma ve çimlendirme ortamlarında gözlenmiştir. Çimlenen embriyoların kök ve sürgün oluşturup bitkiciklere dönüşme oranı en yüksekten sırasıyla; %95.5 ile kontrol ortamında, %80.2 ile 1 mg/l IAA içeren ortamda ve %77.3 ile 1 mg/l Kin içeren ortamda gerçekleştiği saptanmıştır.

Somatik embriyogenesis yoluyla Diyarbakır karpuzu Sürme tipinden rejenere edilen bitkicikler aklimatize edilip arazi şartlarına aktarılarak dikimleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çalışmada sekonder somatik embriyogenesis ve organogenesis de gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Citrillus lanatus,* Diyarbakır karpuzu Sürme, *İn vitro,* Somatik embriyogenesis

ABSTRACT

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THE DIYARBAKIR WATERMELON (*Citrullus lanatus cv.* Sürme)

M.Sc. THESIS

Cihat DEGIRMENCI

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DICLE UNIVERSITY

2021

This research, aimed to develop a regeneration protocol via somatic embryogenesis in the Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus cv.* Sürme*)*. Two different experiments were conducted: Experiment I and Experiment II. In the Experiment II, MS (Murashige and Skoog 1962) was used as a medium and was supplemented with a combination and concentration of TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l), NAA (0.5, 1.0, 1.5 mg/l), and 2.4-D (0.5, 0.75, 1.0 mg/l). Cotyledon segments from 20-days-old seedlings derived from mature seed of genotype Sürme were used as an explant. In Experiment II a medium of MS was supplemented with a combination of BAP (1.0, 2.0, 3.0 mg/l), TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l), NAA (0.05, 0.1, 0.5 mg/l), and 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 mg/l). Cotyledons, hypocotyls, and cotyledon nodes from 5-days-old seedlings derived from mature seed of Surme were used as an explant.

In the Experiment I, supplementing with combination and concetration of TDZ + NAA, the rate of callus formation was 100%. Although the calli were then transformed embryogenic calli, in rate of 100%, except of calli, culturing in MS medium contained single NAA concentrations. Moreover, quite high amount of calli formed from each explant and an average calli weight were determined between 820.1 and 4184.25 mg. In the Experiment II, callus formation rate ranged from 89% and 100% for the combination and concentration of BAP + 2,4-D, and ranged from 61.27% and 100% for the combination and concentration of BAP + NAA. In regard to embryogenic calli, the rate ranged from 75% to 100% for the combination and concentration of BAP + NAA, while it ranged from 0.62% to 86.21% for the combination and concentration of BAP + 2,4-D. The most somatic embryo formation was observed at the combination and concentration of BAP + NAA. The highest average number of somatic embryo (23.2) was determined in MS medium contained 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA. In regard to explant types, the highest average number of somatic embryos for cotyledon, hypocotyl, and cotyledon node were 62.6 (3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA), 46.9 (1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA), and 11.3 (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA). The rate of germination of somatic embryos, in regard to different maturation and germination mediums (MS); IAA (1 mg/l), control (PGR-free), and Kin (1 mg/l) were 52.7%, 35.5%, and 31.8%, respectively. The highest rate of plantlets derived from germinated embryos were 95.5%, 80.2%, 77.3%, respectively for the control, IAA, and Kin contained MS medium.

Regenerated plantlets via somatic embryogenesis in the Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. Sürme), undergoing acclimatization were successfully transplanted to the field. In addition, secondary somatic embryogenesis and organogenesis also were determined.

Key Words: *Citrullus lanatus*, Diyarbakir watermelon genotype Surme, Somatic embryogenesis, *In vitro*

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Dünyada karpuz üretiminde önde gelen ülkeler (ton), (FAO 2020)	2
Çizelge 1.2.	Dünyada karpuz ihracatında önde gelen ülkeler (2017), (FAO 2020)	2
Çizelge 1.3.	Dünyada karpuz ithal eden ülkeler (2017), (FAO 2020)	3
Çizelge 1.4.	Türkiye'de en çok karpuz üreten 10 il (ton), (TUİK 2020)	4
Çizelge 1.5.	Türkiye'deki en çok karpuz üretim alanına sahip 10 il (dekar), (TUİK 2020)	4
Çizelge 3.1.	Hazır MS (Murashige ve Skoog 1962) (M5519) besi ortamı içeriği	34
Çizelge 3.2.	Çalışmada Kullanılan BBD ve Çözücüleri	34
Çizelge 3.3.	Deney I'de kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonları (mg/l)	36
Çizelge 3.4.	Deney II'de kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonları (mg/l)	38
Çizelge 4.1.	Deney I'de TDZ –NAA - 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının ortalama kallus ve embriyogenik kallus oluşum oranına etkisi	49
Çizelge 4.2.	Deney I'de kotiledon eksplantlarında oluşan yaş kallus ağırlığına ait varyans analizi	50
Çizelge 4.3.	Deney I'de kotiledon eksplantlarında oluşan yaş kallusların çap uzunluğuna ait varyans analizi	50
Çizelge 4.4.	Deney I'de meydana gelen yaş kallusların ağırlık ve çap değerleri	51
Çizelge 4.5.	Deney II'de eksplantlarda kallus oluşumuna ait varyans analizi	54
Çizelge 4.6.	Deney II'de BAP – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi	55
Çizelge 4.7.	Deney II'de BAP – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi	56
Çizelge 4.8.	Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşum etkisine ait varyans analizi	56
Çizelge 4.9.	Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi	57
Çizelge 4.10.	Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi	57
Çizelge 4.11.	Deney II'de TDZ – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi	58
Çizelge 4.12.	Deney II'de TDZ – NAA konsanstrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi	58

Çizelge 4.13. Deney II'de TDZ – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi 59

Çizelge 4.14. Deney II'de TDZ – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi 60

Çizelge 4.15. Deney II'de embriyogenik kallus oluşumuna (%) ait varyans analizi 63

Çizelge 4.16. Deney II'de BAP – NAA - 2,4-D konsantrasyon ve kombinnasyonlarının eksplant tiplerinde embriyogenik kallus oluşumuna etkisi 64

Çizelge 4.17. Deney II'de BAP –NAA - 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde embriyogenik kallus oluşumuna etkisi 65

Çizelge 4.18. Deney II'de elde edilen ortalama embriyo sayısı varyans analizi 66

Çizelge 4.19. Deney II'de BAP – NAA ve BAP - 2,4-D konsanstrasyon ve kombinasyonlarının embriyo sayısına etkisi 69

Çizelge 4.20. Somatik embriyoların çimlenme, bitkiciklere dönüşme ve aklimatize oranları 72

Çizelge 4.21. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin (embling) kök uzunluğu 74

Çizelge 4.22. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin (embling) sürgün boyları 75

Çizelge 4.23. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin (embling) aklimatizasyon sürecindeki sürgün boyları 75

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan Diyarbakır karpuzu Sürme tipine ait 1 yıllık olgun tohumlar	29
Şekil 3.2.	*In vitro* BBD içermeyen MS ortamında tohum çimlendirilmesiyle elde edilen Sürme tipi karpuz fidesi, A (5 günlük), B (20 günlük)	30
Şekil 3.3.	Çalışmada kullanılan eksplant tiplerine ait eksplant kaynağı. kot: kotiledon b.k: bölünmüş kotiledon (B) hip:hipokotil (B): radyal kısım çıkarılmış kotiledon çeneği (C)	30
Şekil 3.4.	Tohumların sterilizasyon işlemleri. A: Tohumların sterilant içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılması, B: %70'lik etanol hazırlanması, C: Tohumların sterilizasyon işleminden sonra steril kabin içerisinde kurutulmaya bırakılması	32
Şekil 3.5.	MS besi ortamının hazırlanması (A), pH kontrolü (B), Hazırlanmış MS (C)	33
Şekil 3.6.	Eksplant kesimi ve kallus oluşumu için kültür başlatma işlemleri	35
Şekil 3.7.	Deney I'de yaş kallus ağırlık ve çap ölçüm işlemlerinin yapılması	37
Şekil 4.1.	Modifiye sterilizasyon protokolü uygulanmış tohumlar (A:3. gün, B: 7. gün) ve uygulanmamış olan tohumların çimlenmesinde enfeksiyon tespiti (C ve D 3.gün)	45
Şekil 4.2.	Deney I'deki kültürlerin gelişim aşamaları; A: İlk kültüre alınan eksplantlar (0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l TDZ), B: 1 hafta aradan sonraki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ), C: 4. haftadan sonra ilk altkültürdeki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ), D: 9.haftadaki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ	46
Şekil 4.3.	Deney I'de oluşan embriyogenik yapılar; A: 12.hafta (1.altkültüre kadar 0.25 mg/l TDZ, 2.altkültürde TDZ 0.1 mg/l), B: 1.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ (5.hafta sonunda)	47
Şekil 4.4.	Deney I'de kültürlerin 2.altkültürdeki gelişimleri (12.hafta); A: Başlangıç ve 1.altkültür 0.5 mg/l TDZ, 2.altkültür: 1 mg/l BAP, B: Başlangıç ve 1.altkültür 0.1 mg/l TDZ, 2.altkültür: 1 mg/l BAP	48
Şekil 4.5.	BAP (3 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) destekli MS ortamında eksplant tiplerinin kültüre alınması; kotiledon (A), kotiledon nodu (B), hipokotil (C), kültüre alınması. 2. Haftadaki gelişimleri D: kotiledon, E: kotiledon nodu, F: hipokotil. Eksplantların 3. Haftadan sonraki kallus gelişimleri, kotiledon (G), kotiledon nodu (H), hipokotil (I)	52
Şekil 4.6.	A: Kotiledon; açık yara dokusunda kallus oluşumu (1 mg/l BAP), B: Kotiledon eksplantı yüzeyinde kallus oluşumu (4.hafta, 3 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D), C: Kotiledon çeneği; dokunun yeniden farklılaşıp kallusa dönüşmesi (4.hafta, 3 mg/l BAP), D: Hipokotil; kallus görünümü, 40x (3 mg/l BAP)	53

Şekil 4.7. Deney I'de 2 haftada sonunda eksplant tiplerinde meydana gelen köklenme; A: kotiledon (0.05 mg/l NAA), B: hipokotil (0.05 mg/l NAA), C: hipokotil (0.1 mg/l 2,4-D), D: hipokotil (kontrol, BBD içermez) 53

Şekil 4.8. 6.haftada kotiledon eksplantlarında embriyogenik kallus oluşumu (A: 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, B: 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, C:2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ve 4.haftada hipokotil eksplantında embriyogenik olmayan kallus (D: 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D) 64

Şekil 4.9. Somatik embriyogenesis safhaları: Globular (GL) (A: 2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA,13.hafta), Kalp şekli (B: 1 mg/l BAP , 5.hafta), Torpido (C: Kotiledon çeneği, 2 mg/l BAP, 13.hafta), Kotiledon safhasındaki SE (D: kotiledon çeneği, 2 mg/l BAP, 13.hafta) 67

Şekil 4.10. SE safhaları; A: Kalp şeklindeki SE, GL (globular embriyogenik doku.(3 mg/l BAP,17.hafta) B: Kotiledon safhasındaki SE, Torpido safhasındaki SE (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 21.hafta) 68

Şekil 4.11. Kültürlerde organogenesis sonucu oluşan adventif sürgünler; A: 1 mg/l BAP, kotiledon, 6.hafta, B: 3 mg/l BAP, kotiledon, 6.hafta, C: 2 mg/l BAP, kotiledon, 5.hafta 68

Şekil 4.12. Eksplantların kültüre alınması (A), birinci haftadan itibaren 16/8 ışık-karanlık fotoperiyotta kültürünün sürdürülmesi (B), 1.altkültüre alınması (C), embriyo olgunlaştırma, çimlendirme ortamlarına transfer edilip gelişimlerinin sürdürülmesi (D) 71

Şekil 4.13. Kalp şeklindeki somatik embriyonun (A) olgunlaştıktan sonra çimlenmesi (B) ve ikincil somatik embriyogenesisin oluşumu (C-D), GE: Globular embriyo (C-D) 72

Şekil 4.14. Aklimatizasyona alınmaya başlanan bitkicikler (embling) ,steril torf ortamında 73

Şekil 4.15. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkicikler (embling) 74

Şekil 4.16. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) aklimatizasyonun 4.haftasındaki gelişimleri 76

Şekil 4.17. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) aklimatizasyon sürecini tamamladıktan sonra araziye transfer edilip dikilmesi 77

KISALTMA VE SİMGELER

2,4-D	:2,4-Diklorofenoksi asetik asit
2iP	:N-izopentil adenine
ABA	:Abscisik asit
BA	:6-benzilaminopurin
BAP	:6-benzilaminopurin
CPPU	:N-fenilurea
GA_3	:Gibberellik asit
IAA	:İndol-3-asetik asit
IBA	:İndol-3-butirik asit
Kin	:Kinetin
MS	:Murashige ve Skoog (1962)
NAA	:α-Naftalen asetik asit
NOA	:Naftoksi asetik asit
SE	:Somatik embriyogenesis
TDZ	:Thidiazuron
Zea	:Zeatin
d	:Dakika
s	:Saniye

1. GİRİŞ

Karpuz 4 000 yıldan fazladır kültürü yapılmakta olan önemli bir bahçe bitkisidir (Huang ve ark. 2006). Karpuz *Cucurbitaceae* familyasından *Citrullus* cinsine ait tek yıllık bir sebze olup gen merkezi tropikal Afrika'dır (Decoteau 2000). *Cucurbitaceae* yaklaşık 130 cins ve 900 tür içeren kısmen geniş bir familyadır (Jeffrey 1980). Karpuzun yabani formlarının Kuzey Doğu Afrika'da bulunduğundan dolayı orijinin burası olduğu açıklanmaktadır (Renner 2017). Ancak, bazı araştırmacılar karpuzun gen merkezinin Anadolu, İran, Orta Asya ve Amerika olabileceğini söyleseler bile, söz konusu bölgelerde karpuzun herhangi bir yabani formu görülmemiştir. Dört alt türü bulunmaktadır: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai, *Citrullus colocynthis L.* Schrad, *Citrullus ecirrhosus* Cogn., *Citrullus naudinianus* (Sond) Hook. (Esquinas-Alcazar ve Gulick 1983) Ancak ekonomik olan türler; *Citrullus lanatus* ve *Citrullus colacynthis'*dir. *Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum* ve *Nakai,* orjini Güney Afrika olan tek yıllık bir bitki olup ülkemizde özellikle İç Batı, Güney ve Güneydoğu Anadolu'da yetiştiriciliği yapılmaktadır (Seçmen ve ark. 2000). Ayrıca Güneydoğu Anadolu Bölgesinin kabakgiller familyasının mikro gen merkezi olmasından dolayı Diyarbakır'da yoğun bir karpuz ve diğer kabakgiller türleri yetiştiriciliği yapılmaktadır (Demir 1974).

Diyarbakır bölgesinde yetiştiriciliği yoğun bir şekilde yapılan, Diyarbakır'ın simgesi haline gelmiş, adına festivaller, yarışmalar ve çeşitli etkinlikler düzenlenen ve şehirle özdeşleşmiş, geçmişten beri 60-75 kg ağırlığına ulaşan Diyarbakır karpuz tiplerinden en irisi "Sürme" tipi olup diğer yerel genotipler; "Beyazkış", "Karakış", "Pembe" ve "Ferik" tir. Dicle nehri kenarındaki arazilerde kendine has yetiştirme teknikleriyle yapılan karpuz tarımı bölge halkının ekonomik, sosyal ve kültürel yaşantısında çok önemli bir yere sahiptir (Pirinç 2004).

Karpuz yetiştiriciliği, dünyada ve Türkiye'de oldukça büyük ölçeklerde yapılmaktadır. Dünya genelinde domatesten (182 milyon ton/yıl) sonra 103.9 milyon ton/yıl ile karpuz en çok üretimi yapılan ikinci sebzedir. Karpuz üretiminde lider ülkeler sırasıyla Çin (62.8 milyon ton/yıl), İran (4.11 milyon ton/yıl), Türkiye (4.03 milyon ton/yıl), Hindistan (2.52 milyon ton/yıl), Brezilya (2.24 milyon ton/yıl) ve diğer üretici ülkeler ile devam etmektedir (Çizelge 1.1), (FAO 2020).

Çizelge 1.1. Dünyada karpuz üretiminde önde gelen ülkeler (ton), (FAO 2020)

Ülke	2014	2015	2016	2017	2018
Çin	61.702.430	62.888.866	62.407.633	63.357.881	63.024.614
İran	4.010.808	3.713.807	4.093.460	4.076.042	4.113.711
Türkiye	3.885.617	3.918.558	3.928.892	4.011.313	4.031.174
Hindistan	1.810.000	2.145.000	2.325.000	2.182.000	2.520.000
Brezilya	2.171.448	2.119.559	2.088.048	2.312.993	2.240.796
Cezayir	1.614.301	1.814.435	1.877.677	1.891.274	2.095.757
Üzbekistan	1.696.100	1.853.594	2.044.929	2.030.992	1.836.959
Rusya	1.427.743	1.666.308	1.884.087	1.815.022	1.969.954
ABD	1.508.780	1.609.030	1.802.940	1.842.360	1.771.051
Dünya	**99.201.126**	**100.976.838**	**102.414.316**	**103.225.509**	**103.931.337**

Dünya karpuz ihracatında önde gelen ülkeler Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Dünyada karpuz ihracatında önde gelen ülkeler (2017), (FAO 2020)

No	Ülke	Miktar (USD $)	No	Ülke	Miktar (USD $
1.	**İspanya**	366.479.000	12.	**Guatemala**	26.454.000
2.	**Meksika**	253.710.000	13.	**Kosta Rika**	23.631.000
3.	**İran**	149.749.000	14.	**Macaristan**	20.227.000
4.	**ABD**	122.179.000	15.	**Malezya**	19.657.000
5.	**Vietnam**	93.291.000	16.	**Mısır**	17.383.000
6.	**İtalya**	81.978.000	17.	**Fransa**	17.189.000
7.	**Hollanda**	81.847.000	18.	**Panama**	13.447.000
8.	**Fas**	80.337.000	19.	**Almanya**	13.162.000
9.	**Yunanistan**	51.460.000	20.	**Ürdün**	10.425.000
10.	**Brezilya**	36.336.000	...	**...**	...
11.	**Çin**	31.385.000	26.	**Türkiye**	6.026.000
	Dünya		**1.618.846.000**		

Dünya karpuz ihracatında önde gelen ülkeler Çizelge 1.2'de görüldüğü gibi İspanya birinci sırada yer alırken onu ikincilikle Meksika, üçüncülükle İran ve sırasıyla diğer ülkeler izlemektedir. Türkiye, karpuz üretiminde İran'dan sonra 3.sırada yer almasına rağmen karpuz ihracatında 26. Sırada yer almaktadır. İhracatçı ülkeler incelendiğinde, Türkiye'nin karpuz üretiminde potansiyeli çok yüksek olmasına rağmen ihracattaki payı çok düşük görünmektedir. Toplam dünya karpuz ihracat değeri 1.6 milyar $ iken Türkiye'nin ihracat payı %0.37 ile 6 milyon $ olmuştur. Dünyadaki en büyük

karpuz ithalatçısı ülkeler arasında ABD yaklaşık 350 milyon $ ile ilk sırada yer alırken; 250 milyon $ ile Almanya, 118 milyon $ ile Fransa ve çoğunluğunu Avrupa ve İskandinav ülkeleri izlemektedir. Toplam dünya karpuz ithalat hacmi 1.7 milyar $ (Çizelge 1.3). Dünya karpuz ithalat ve ihracat ticaret hacmine bakıldığında karpuzun ekonomik değeri yüksek bir ürün olduğu açıktır.

Çizelge 1.3. Dünyada karpuz ithal eden ülkeler (2017), (FAO 2020)

No	Ülke	Miktar (USD $)	No	Ülke	Miktar USD($)
1.	**ABD**	348.991.000	11.	**Çin**	31.864.000
2.	**Almanya**	229.632.000	12.	**Çekya**	30.193.000
3.	**Fransa**	118.057.000	13.	**Kuveyt**	22.479.000
4.	**Kanada**	115.037.000	14.	**İsviçre**	22.205.000
5.	**Irak**	113.058.000	15.	**Avusturya**	22.166.000
6.	**Hollanda**	101.295.000	16.	**İsveç**	21.116.000
7.	**Britanya**	74.028.000	17.	**İtalya**	20.435.000
8.	**Polonya**	54.422.000	18.	**Belçika**	19.695.000
9.	**İspanya**	48.928.000	19.	**Norveç**	19.094.000
10.	**BAE**	45.935.000	20.	**Danimarka**	16.599.000
	Dünya		**1.701.983.000**		

Türkiye'de karpuz yetiştiriciliği 83.365 ha üretim alanı ile yaklaşık 828 bin ha olan toplam sebze üretim alanının %10'unu oluşturmaktadır ve 12.84 milyon ton/yıl domates üretimden sonra karpuz 3.87 milyon ton/yıl üretimiyle en çok üretilen ikinci sebze olup Türkiye'nin toplam 31 milyon ton/yıl sebze üretiminin %12'sini oluşturmaktadır. Türkiye'de karpuz üretiminin büyük bir kısmı Akdeniz bölgesinde yapılmakta olup bir kısmı örtüaltında yetiştiriciliği yapılmaktadır. Akdeniz bölgesini sırasıyla, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri takip etmektedir. Sırasıyla en büyük karpuz üreticisi olan iller; Adana, Antalya, Bursa, Mersin, Şanlıurfa, Diyarbakır, İzmir, Manisa, Muğla ve Samsun'dur (Çizelge 1.4) Diyarbakır 2019 yılında toplam 3.522 ha'lık karpuz üretim alanı ve yaklaşık 143 bin ton/yıl üretimi ile Türkiye'nin toplam 3.87 milyon ton/yıl karpuz üretiminin %4'ünü gerçekleştirmiştir (TUİK, 2020). Ülkemizde en fazla karpuz üretim alanına sahip illerimize ait veriler Çizelge 1.5 ' te verilmiştir.

Çizelge 1.4. Türkiye'de en çok karpuz üreten 10 il (ton), (TUİK 2020)

İl	2015	2016	2017	2018	2019
Adana	781.716	796.795	831.684	1.006.322	867.919
Antalya	443.882	458.037	487.794	498.357	444.553
Bursa	162.487	141.703	156.970	177.522	190.735
Mersin	147.569	139.900	148.914	151.057	167.238
Şanlıurfa	130.426	137.154	130.957	171.062	165.954
Diyarbakır	**174.462**	**167.780**	**163.218**	**165.418**	**142.818**
İzmir	226.084	201.558	196.544	149.932	130.340
Manisa	116.319	107.076	108.074	108.660	113.698
Muğla	99.179	102.619	96.876	101.780	105.676
Samsun	145.404	138.800	145.675	100.845	99.885
Türkiye	**3.918.558**	**3.928.892**	**4.011.313**	**4.031.174**	**3.870.515**

Çizelge 1.5. Türkiye'deki en çok karpuz üretim alanına sahip 10 il (dekar), (TUİK 2020).

İl	2015	2016	2017	2018	2019
Adana	121.200	121.115	120.206	144.886	123.676
Antalya	79.535	81.780	81.613	83.529	76.845
Bursa	38.812	34.000	35.092	38.106	38.811
Diyarbakır	45.695	43.883	43.382	44.165	35.220
Şanlıurfa	42.278	39.399	37.856	37.881	35.181
Manisa	35.780	33.420	33.683	33.350	34.194
Mardin	43.883	37.396	31.405	25.550	27.450
İzmir	47.831	44.490	43.239	31.262	27.440
Ankara	39.160	40.583	40.028	24.253	24.116
Denizli	24.080	24.545	24.039	22.252	21.282
Türkiye	**935.458**	**919.927**	**904.884**	**863.610**	**833.657**

Karpuz besin değeri açısından da zengindir. Karpuz meyvesinde şeker oranı oldukça yüksek miktarda bulunur. Bu şekerin büyük bir kısmı glikozdan oluşur. Karpuzun değerlendirilen kısmında %7 ile %10 oranında çözünebilir kuru madde (SÇKM), A, B ve C vitaminlerinin yanı sıra bir çok mineral madde içermektedir (Vural ve ark. 2000). Karpuz meyvesi yaz döneminde serinletici ve susuzluğu giderici etkisinden dolayı çok tüketilmektedir. Karpuz meyvesinin pembe renkli etli kısmı çiğ olarak tüketilmektedir. Ancak karpuzlu limonata, karpuzlu kek, kavrulmuş karpuz ve karpuz turşusu da başlıca karpuz tüketim yöntemleridir (Siddiqui ve ark. 2018). Ayrıca, çekirdekleri de haşlanarak ve kavrularak çerezlik olarak tüketilmesi yanısıra gıda, kozmetik ve ilaç sanayisinde hammadde olarak kullanılmaktadır.

Karpuz A, B serileri ve C vitaminleri; potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor ve sodyum mineralleri; likopen, beta karoten, fitofluen, leutin, fitoen ve neurosporen dahil karotenoidler gibi besin değeri olan çeşitli bileşenlere sahiptir. Ayrıca karbonhidratlar, temel ve temel olmayan amino asitler, doymamış yağ asitleri, sağlıklı doymamış yağ asitleri ve su açısından da zengindir (Siddiqui ve ark., 2018). Farmakolojik analizler, *C. lanatus*'un antioksidan, antienflamatuar, hepatoprotektif, antiplazmodiyal, antigiardial, antidiyabetik, antiülser, analjezik, antimikrobiyal ve laksatif etkilerini ortaya çıkarmıştır (Siddiqui ve ark. 2018). Karpuz mükemmel C vitamini kaynağı olmasının yanısıra Beta, alfa karoten, prolikopen, teta cis likopen, arginine ve citrulline de içermektedir. Karpuz bu organik bileşiklerinden dolayı serbest radikal düşmanı ve antioksidan kaynağı olması yanında ayrıca vazilatör (damar genişleticidir) özelliktedir (Perkins-Veazie 2009).

Günümüz kültür bitkileri; insanlar ve hayvanlar için gıda kaynağı, endüstriyel kullanım için hammadde ve biyoyakıt olarak kullanılmaktadır. Ancak artan dünya nüfusu ve gelişen gıda tükem alışkanlıkları yüksek kalitede meyve ve sebzeye olan talebi artırmaktadır. FAO (2017) tahmin raporlarına göre 2050 yılına kadar dünya nüfusu 9.73 milyara varacaktır. Yani bugünkü 7.66 milyar (Anonim 2020) dünya nüfusunun %27'sinden daha fazlası ve bu yükselme neredeyse tüm gelişmekte olan ülkelerde meydana gelecektir. Bunun yanısıra, kentleşme oranının hızlandırılmasından dolayı, muhtemelen yüksek gelir sahiplerinin eşlik etmesiyle populasyonun %70'inin kentleşeceği öngörülmektedir. Bu büyük kent populasyonunu beslemek için gıda üretiminin %70'lere kadar yükselmesi gerekir ki mesela bugünkü toplam 2.6 milyar ton

olan tahıl üretiminin yaklaşık 3 milyar tona çıkarılması gerekecektir. Yakın geçmişte insanların ve hayvanların beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri artık kimyasal ve biyoyakıt üretiminde hammadde olarak da kullanılabilmesi durumu tarımsal üretimindeki talebi gittikçe artıracaktır. Ekilebilir tarım arazilerinin kısıtlı olduğu düşünülürse, birim alandaki ürün verimi artıracak tarım stratejilerinin geliştirilmesi zorunludur. Bu sebeple, artan dünya nüfusunu beslemek ve hammadde talebini karşılamak için bitki fonksiyonlarının ve gelişiminin düzenlenmesini ve bitkinin yenilebilir ve kullanılabilir kısımlarına biyokütlesinin nasıl dağıltığını anlamak, sürdürülebilir tarımsal üretimi güvenceye almak için çok önemlidir (Altman ve Hasegawa 2011).

Klasik tarım, hem dünya genelindeki gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin gıda üretimi talebini karşılamada hem de yeni tarımsal ürün pazarı için artık yeterli değildir. İnsan bekası gibi tarımsal üretimdeki devamlı artış da klasik ıslah ve bitki biyoteknolojisinin etkin bir şekilde entegre edilmesine bağlıdır. Yeşil Devrim (The Green Revolution) Hindistan ve birçok diğer Doğu Asya ülkelerinde buğday üretiminde 10 kat artışa ve çoğu insanlar gibi 3 kez beslenmelerine öncülük etmiştir. Bu, gıda üretimindeki kıyaslanabilir artışa yol açan, bodur pirinç varyetelerinin tarımda kullanımının adaptasyonu sonucudur. Ancak, geliştirilmiş çeşitlerin faydaları bütün yönleriyle kullanıldığından ıslah edilmeleri için alternatif çözümler gerekmektedir. Şu an, klasik ıslah ile entegre edilmiş olan biyoteknoloji "Herdem Yeşil Devrimini (Evergreen Revolution) yaratmanın eşiğindedir. Tarımsal ürün ve gıdaların tedariğini artırmanın yolu; Moleküler markır destekli seleksiyon ve transgenik bitki üretimi dahil yeni bitki biyoteknoloji araçlarından yararlanarak bitki gelişimi için bitki islahı verimliliğini artırmaktır. Bu ıslah edilmiş ve transgenik varyetelerin hızlı klonal çoğaltım araçlarından biri de somatik embriyogenesistir (Altman ve Hasegawa 2011).

Somatik embriyogenesis ilk defa 1958'de hem Steward hem de Reinert tarafından kültüre alınan hücreler için tanımlanmıştır. Somatik embriyogenesis somatik hücrelerden embriyo üretebilen eşsiz bir işlemdir. Somatik embriyogenesis ile zigotik embryogenesis arasındaki fark, sperm hücresi ile yumurta hücresinin füzyona uğrayıp zigotu oluşturmasıdır. Somatik embriyolar da zigotik embriyolar gibi; morfolojik olan globular, kalp, torpido ve kotiledon safhalarından geçmektedir. Somatik embriyogenesis *in vitro* dışında, doğal olarak örneğin; *Kalanchoe*'da ve *turunçgillerin* nüseller dokularından oluşabilmektedir. Kendiliğinden poliembriyogenik olan türler daha çok embriyogenik

dokular oluşturmasına karşın, embriyogenik olmayan türler daha az somatik embriyolar oluşturmaktadır. Somatik embriyogenesis kültürünün başlatılabilmesi için uygun BBD'lerin belirli oranlarının kombinasyonları gereklidir. Ancak bu kombinasyonlar ve oranlar genotipe göre farklılık göstermekle birlikte, çoğu kültürler embriyo indüksiyonu için yüksek oranda oksine, özellikle de 2,4-D'ye gereksinim duymaktadır. Somatik embriyogenesis iki tipe ayrılır; Direkt ve indirekt SE. Direkt somatik embriyogenesis; nüseller, stilar ve polen gibi tek hücre veya hücreler grubundan kallus oluşmaksızın embriyoların eşeysiz olarak meydana gelirken, indirekt somatik embriyogenesiste ise öncelikle kallus bitki dokusundan oluşur ve daha sonra oluşan bu kallus dokusundan veya hücre süspansiyon kültüründen embriyolar meydana gelir (Onay ve ark. 2012; Bhatia ve ark. 2015; Rose ve Song, 2017). SE uygulamalarından bazıları şöyle sıralanabilir; sentetik tohum üretimi, elit tiplerin klonal çoğaltımı, double haploid bitki üretimi, transgenik bitkilerin çoğaltımı, hızlı ve geniş ölçekli F_1 hibrit üretimi, biyoreaktör ile seri üretim, somatik hibridizasyon, germplazm muhafazası, Kriyoprezervasyon, genetik mühendisliği ve bitki biyoteknolojisinde temel Ar-Ge aracı (Loyola-Vargas ve Vázquez-Flota 2006; Altman ve Hasegawa 2011; Rose ve Song 2017)**.** Bunlara ek olarak somatik SE konvansiyonel mikroçoğaltım karşısında bir çok avantaja sahiptir:

- 1 lt besi ortamı başına milyonlarca somatik embriyo gibi büyük ölçekte somatik embriyogenesis kültürüne imkan sağlar.
- Bu denli eşzamanlı kök ve sürgün üretim rejenerasyon sistemi, konvansiyonel mikroçoğaltımdaki kök başlatma safhasına olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır.
- Kültür yöntemi düşük iş girdisiyle kolayca kültür ve altkültürü artırmaya izin verir.
- Embriyo oluşumu ve çimlenmenin senkronize olabilmesi için kültürler manipüle edilebilir.
- Minimum iş maliyeti ile maksimum bitki üretimi gerçekleştirilebilir.
- Uzun vadeli depolanmanın mümkün olmasından dolayı zigotik embriyolarda olduğu gibi somatik embriyo dormansisi düşürülebilir.
- Taşınması daha kolay ve ekonomiktir (Bhatia ve ark. 2015).

Ekilebilir tarım arazilerinin sınırlı olduğu gerçeği bilim insanlarını birim alandan daha yüksek verim elde etmeye ve teknolojiden yararlanılarak kurulan modern laboratuvarlarda yapay olarak gerekli çevre şartları sağlanıp alandan tasarruf edilerek bitki doku kültürü teknikleri ile sürekli bitkisel üretim yapmaya yöneltmiştir. Buna ilaveten, nesli tükenme riskiyle karşı karşıya kalan ekonomik ve ıslah materyali olması açısından önemli olan, transgenik ve moleküler düzeyde ıslah edilmiş bitkilerin klonal çoğaltımında bitki doku kültürü teknikleri olan somatik embriyogenesis ve organogenesise gereksinim duyulmaktadır. Ancak bu tekniklerin uygulanabilmesi için optimize edilmiş bir rejenerasyon protokolüne ihtiyaç duyulmaktadır.

Bugüne kadar literatürde Diyarbakır karpuzu Sürme ile ilgili herhangi bir somatik embriyogenesis çalışması rapor edilmemiştir. Bu çalışma ile Diyarbakır karpuzu Sürme tipi (*Citrullus lanatus (*Thunb.) Matsum. ve Nakai) için somatik embriyogenesis yoluyla bir çoğaltım protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada farklı yaşlarda ekplant tipleri ve bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) oksin ve sitokinin tiplerinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılarak somatik embriyogenesis üzerine etkileri araştırılarak uygun eksplant tipi, oksin ve sitokinin tiplerinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının embriyogenik doku geliştirme üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda elde edilecek bulgular Diyarbakır karpuzu Sürme tipi ve diğer yerel genotiplerinde yapılacak sentetik tohum, süspansiyon ve hücre kültürü, *A.tumefaciens* ile gen transformasyon, modern ıslah ve hızlı klonal çoğaltım çalışmaları için temel teşkil edecek nitelikte olması bu tez çalışmasının özgün değerini artırmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kabakgillerde (*Cucurbitaceae*) Yapılmış *İn vitro* Çalışmalar

2.1.1. Karpuzda *İn vitro* Kültür Çalışmaları

Barnes (1979), hem diploid hem de triploid karpuz (*Citrullus lanatus)* üretimi için de kullanılabilen ekonomik bir *in vitro* çoğaltım sistemi geliştirilmiştir. 1 mg/l Kinetin ve 0.05 mg/l IAA içeren modifiye Linsmaier ve Skoog besi ortamında 1-3 mm'lik sürgün uçları kültüre alınmıştır. 5 hafta sonunda her eksplanttan 15 mm'den büyük ortalama 4.5 aksillar sürgünler elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 1.9 mg/l IAA içeren besi ortamında 3 haftalığına köklendirmek amacı ile kültüre alınmıştır. İyi köklenen bitkicikler olgunlaştırılıp sera şartlarına ve ardından da arazi koşullarına transfer edilebilmek için 3 haftalığına perlit:kum (1:1) ortamına başarı ile aktarılmıştır. Bir haftalık 10 000 adet transplant maliyet tahmini her bir aktarılmış bitkicik için yaklaşık 0.16 dolar olduğunu aktarmışlardır.

Yongjiong ve ark.(1991), triploid karpuz (*Citrullus vulgaris Schrad.*) hipokotilleri 0.02 mg/l 2,4-D ve 0.6 mg/l BA ile desteklenen MS besi ortamında güçlü ve kompakt kallus elde edilmiş. Adventif sürgünler çeşitli konsantrasyonlarda BA, IAA ve tricontanol içeren besi ortamına (MS) aktarılarak kallustan üretilmiş. 0.3 veya 0.4 mg/l BA ve 6 mg/l B_1 vitamini ile desteklenen MS üzerinde adventif sürgünlerden tomurcuk kümeleri elde edilmiştir. 0.2 mg/l IAA ve vermikülit içeren agarsız ½ MS ortamında Adventif sürgünler kök geliştirebilmiştir. Sırasıyla; haploid (n=11), diploid (2n=22), triploid (3n=33) ve aneuploid bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Tabei ve ark. (1993), etkili bir rejenerasyon sistemi oluşturmak amacıyla karpuz (*Citrullus lanatus L.*) kültür şartları araştırılmıştır. Adventif sürgünler, 10 mg/l IAA ve 10 mg/l BA içeren MS besi ortamında etkili bir şekilde (%50) meydana gelmiştir. Genç fidelerden alınan kotiledon eksplantları 10 mg/l IAA ve 10 mg/l BA ihtiva eden besi ortamında (MS) 3 günlüğüne veya hormonsuz MS ortamında 1 günlüğüne önkültüre alınması ile sırasıyla %46 ve %42 oranında yüksek oranda sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Yüksek frekansta sürgün oluşumunda bazal kotiledon bölgesi %53.3 ile apikal bölgeden (%23) daha fazla etkili olmuştur. Bu etkili sürgün rejenerasyonunda varyeteler arasında farklılıklar gözlenmiştir. Kikidoma çeşidi %68 ile en yüksek sürgün

oluşturma oranını vermiş olduğunu aktarmışlardır.

Choi ve ark. (1994), karpuzun (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai cv. Sweet Gem ve Gold Medal) farklı kotiledon eksplantları 1 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alındığında kotiledonların proksimal kenarlarda adventif sürgünler oluşmuştur. 16 /8 fotoperiyot sürgün rejenerasyonu için gerekli olmuştur. Transgenik bitkiler elde etmek için Sweet Gem eksplantları 48 saatliğine 1 mg/l BA ve 39.24 mg/l β-hydroxyacetosyringone içeren MS besi ortamında *A. tumefaciens.* LBA4404 ile kültüre alınıp zayıflatılmış pBI121 ikili vektörünü barındıran CaMV 35S *β*-glucuronidase (GUS) gen füsyonu gen taşıyıcısı ve neomisin fosfotransferaz destekleyici ve pozitif seleksiyon markırı olarak kullanılmıştır. 48 saatlık kültürden sonra kültürler, 1 mg/l BA, 250 mg/l karbenisilin ve 100 mg/l kanamisin içeren besi ortamına aktarılıp aydınlıkta kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra adventif sürgünler eksplantların üzerinde oluşmuştur. Yeterince geliştirilmiş hücrelerin *A. tumefaciens* tarafından aktarılması için kotiledon eksplantları 1 mg/l BA içeren besi ortamında 5 günlüğüne önkültüre alınmıştır. Southern blot analizi, GUS geni içeren rejenerantların genomik DNA'sı ile birleştiğini tespit etmiş olduğunu bildirmişlerdir.

Compton ve ark. (1996), Dixielee, Jubilee II, Mickylee, Minilee ve Royal Sweet diploid karpuz (*Citrullus lanatus (*Thunb) Matsum. ve Nakai) çeşitlerinin kotiledon kısımları (3x5 mm) sürgün başlatma ortamında 6 haftalık kültür sonucu adventif sürgünler elde edilmiştir. Elde edilen tetraploid ve diploid karpuz bitkileri, bitkilerin yapraklarındaki bekçi hücre çiftindeki kloroplast sayılarının sayılmasıyla tespit edilmiştir. Kloroplastların ortalama sayısı rejenere edilen tetraploid bitkiler için 19.1, diploidler için ise 11.2 olduğu belirtilmiştir. Bu değerlerin tohumdan elde edilen tetraploid ve diploid bitkilere çok yakın olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın verimli ve kimerasız tetraploid bitki üretiminin doku kültürü ile yapılabileceğini ispatladığını aktarmışlardır.

Compton (1999), ışığın, 4 tane diploid karpuz (*Citrullus lanatus (*Thumb.) Matsum ve Nakai) çeşidinin kotiledonlarından sürgün organogenesisinde embriyo çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Karanlıkta embriyo çimlendirme, 16 saat fotoperiyotlu sürgün rejenerasyon ortamında 6 haftalık inkübasyon süresince olgun sürgün üreten eksplant sayısını önemli ölçüde ilerletmiştir. Embriyolar karanlıkta

çimlendirildiğinde Crimson Sweet çeşidinin sürgün üreten eksplant sayısının yüzdesi 2 katından fazla, Sweet Gem ve Yellow Doll için 1.5 katına çıkmıştır. Fidelerin karanlıkta önkültüre alınmasıyla Minilee'nin sürgün üreten eksplant yüzdesi önemli ölçüde değişmemiştir. Bu çalışmanın en iyi sürgün rejenerasyonun elde edilmesi için kotiledon eksplantlarının hazırlanmasından önce embriyoların karanlıkta çimlenmesi gerektiğinin kanıtladığını bildirmişlerdir.

Zarka ve ark. (2000), 5 farklı karpuz (*Citrullus lanatus)* genotiplerinin kotiledon kısımları kullanılarak organogenesis başlatılmıştır. Kotiledon kısımlarının üzerinde sürgün oluşumunu yükseltmek için 5 farklı BBD (IAA, BA, ABA, NAA ve 2,4-D) kullanılmıştır. Organogenesis safhaları ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile takip edilmiştir. Sürgünler kültüre alındıktan 4 hafta sonra elde edilmiş ve köklendirilmek için BBD içermeyen besi ortamına aktarılmıştır. 3 5 hafta aradan sonra kök gelişimi gözlemlenmiş ve çalışma sonucunda tüm bitkilerde kök ve yaprak oluşumu gözlemlenmiş. Bu rejenerasyon metodunun transformasyon deneylerine uygulanabileceğini aktarmışlardır.

Chaturvedi ve Bhatnagar (2001), Sugar Baby karpuz çeşidinin (*Citrullus lanatus)* kotiledon eksplantlarından in vitro sürgün rejenerasyon için bir protokol tanımlanmıştır. Eksplantlar 7 günlük steril fidelerden elde edilmiştir. 7 günlük fide eksplantların en yüksek sürgün oranı 0.68 mg/l BA + 0.6 mg/l 2iP ve 0.68 mg/l BA + 0.53 mg/l IAA içeren MS besi ortamında gözlenmiştir. Daha sonra eksplantlarda kallus oluşumundan sonra sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Oluşan sürgünler köklendirildikten sonra %55 başarı oranıyla toprak saksıklara transfer ettiklerini rapor etmişlerdir.

Pirinç ve ark. (2003), Diyarbakır karpuzu Sürme tipinin kotiledon eksplantları ile organogenesis ve rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Kotiledon eksplantlarının kültüre alınmasından 3 hafta sonra adventif sürgünler elde edilmiştir. BA ve Kinetinin değişik dozlarının adventif sürgün organogenesis üzerindeki etkileri incelenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu, test edilen tüm kinetin konsanstrasyonları ile kıyaslandığında en yüksek olarak 0.5 mg/l ve 1 mg/l BA içeren besi ortamında meydana gelmiştir. Oluşan 1-2 cm uzunluğundaki sürgünler NAA içeren MS ortamında köklendirilmiş elde edilen bitkicikler %50'den fazla bir başarı ile araziye transfer edilmiştir. Diyarbakır karpuzu Sürme'nin *in vitro* olarak rejenere edilebileceğini

bildirmişlerdir.

Sultana ve ark. (2004), arazide yetişen 5 günlük karpuz (*Citrullus lanatus* Thumb.) fidelerinin yaprak segmentlerinde kallus kültürü ile bitkicik rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı BBD konsantrasyonları kullanılarak çeşiti frekanslarda kallus ve bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. 2.5 mg/l 2,4-D ile desteklenen MS ortamında en yüksek kallus oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra oluşan bu kalluslar 1 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA ihtiva eden MS besi ortamına transfer edilmesi ile adventif sürgünler oluşmuş ve bunları aynı besi ortamında altkültüre alınarak bitkiye dönüştürülmüştür. 0.1 mg/l NAA kök üretiminde etkili bulunmuştur. Bitkicikler öncelikli olarak önce aklimatize edilip ardında da araziye aktarılmıştır. Arazi koşullarındaki hayatta kalma oranının %80 olduğunu rapor etmişlerdir.

Krug ve ark. (2005), sitokinin ile desteklenen MS besi ortamında karpuzun (*Citrullus lanatus)* kültüre alınan kotiledon segmentlerinden adventif sürgün oluşturması ile in vitro organogenesis araştırılmıştır. Kotiledon eksplantlar, in vitro olarak yetiştirilen 1 3 ve 5 günlük fidelerden toplanmıştır. Kotiledonlar kenarlarından 1 2 mm kesilip daha sonra enine iki eşit parçaya (proximal ve distal) kesilmiştir. Elde edilen bilgiler, 1 mg/l BAP ve hindistan cevizi sütü (%10) ile desteklenen MS besi ortamında 3 günlük fidelerin proximal kotiledon segmenlerinin in vitro karpuz organogenesisinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Organogenesisin kallus oluşumu olmaksızın direkt olarak eksplantların epidermis ve altepidermis tabakalarının üzerinde oluştuğunu histolojik analizler göstermiştir. Adventif sürgünler, sürgün tepe meristemi ve yaprak primordiyasının gelişimi ile karekterize edilmiştir. Ayrıca adventif sürgünlere dönüşmeyen yumruların oluştuğunu da belirtmişlerdir.

Shalaby ve ark. (2008), triploid karpuz hibritlerinin kotiledonları ve sürgün tipleri kullanılarak in vitro çoğaltım protokolü gerçekleştirilmiştir. Kotiledon ve sürgün tipleri kullanılarak 5 adet BA konsantrasyonu denenmiştir. 6, 15 ve 20 günlük fidelerin kotiledon ve sürgün tipleri BA'nın çeşitli (0.5, 1.0, 2.25, 5.5, 10 mg/l) konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu 10, 2.25 ve 5.5 mg/l BA içeren besi ortamında gözlenmiştir. Aksiller sürgünler triploid karpuzun sürgün tiplerinden elde edilmiş ve çoklu çoğaltım oranı 2 ile 5.6 bitki arasında olup BA konsantrasyonuna ve genotipe bağlı olduğu açıklanmıştır. Sürgünler kesilip BBD

içermeyen besi ortamında büyütülmüştür. Büyütülen sürgünler içinde 0.1 mg/l NAA bulunan MS besi ortamında köklendirilmiştir. Köklenen bitkiler başarılı bir şekilde sera şartlarına aklimatize edilip daha sonra %80 başarı ile toprağa transfer edildiğini bildirmişlerdir.

Suratman ve ark. (2009), diploid ve triploid sarı karpuz (*Citrullus mohrh schard*) çeşitleri olan Hwang Fong Yellow Queen, Round Dragon ve Chin San Seedless'in kotiledonları kullanılarak sürgün rejenerasyonu araştırılmıştır. Aksilar meristemlerden adventif olmayan çoklu sürgünler elde edilmiştir. 4 5 günlük in vitro fidelerin kotiledon kısımlarından karpuz sürgün rejenerasyonu sistemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. En yüksek ortalama çoklu sürgün sayısı Hwang Fong Yellow Queen çeşidinin 4.5 mg/l BAP içeren MS ortamında 9.83, 1.12 mg/l BAP içeren MS ortamında Chin San Seedless 8.87 ve 2.25 mg/l BAP içeren MS besi ortamında Round Dragon ise 6 olmuştur. En yüksek çimlenme ve ortalama sürgün sayısına sahip olmasından dolayı Hwang Fong Yellow Queen çeşidi ile araştırmalara devam edilmiştir. Çeşitler, 0.1 mg/l IAA bulunan ½ kuvvetindeki MS ortamında %80 başarı ile köklendirilme gerçekleştirilmiştir. Köklenen bitkiciklerin %50'si toprağa şaşırtıldığını rapor etmişlerdir.

Ganasan ve Huyop (2010), *Citrullus lanatus cv.* Round Dragon çeşidi karpuzun kotiledonları kullanılarak etkili bir *in vitro* rejenerasyon protokolü gerçekleştirmeyi amaçlamışlardır. Adventif sürgün oluşumu için en iyi şartları belirlemek için 2.3 mg/l BAP bulunan MS besi ortamında 5, 7 ve 9 günlük fidelerin kotiledon eksplantları kültüre alınıp rejenerasyon potansiyeli test edilmiştir. En yüksek in vitro sürgün rejenerasyonu 6. Haftanın sonunda %93 ve eksplant başı 19.8 sürgün ile, 5 günlük fidelerin eksplantlarından elde edilmiştir. 5 günlük fidelerden elde edilen sürgünler 6. haftadan sonra BBD içermeyen MS sürgün büyütme ortamına 4 haftalığına transfer edilmiştir. IBA, IAA ve NAA'nın çeşitli konsantrasyonlarının köklendirme üzerindeki etkileri ½ ve 1/1 kuvvetteki MS köklendirme ortamında çalışılmıştır. 0.1 mg/l IBA %100 kök oluşturması ile köklendirmeyi teşvikte IAA ve NAA'dan çok daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir. Büyütülen bitkicikler 3 hafta boyunca 0.1 mg/l IBA destekli MS ortamında köklendirildikten sonra ex vitro şartlarda başarı ile aklimatize edildiğini rapor etmişlerdir.

Khatun ve ark. (2010), karpuzun (*Citrullus lanatus* (Thunb.)) kotiledon ve internodlarından kallus başlatma ve ardından regejenerasyon potansiyelini ortaya

çıkarmak için bir çalışma yürütmüşler. 1 mg/l 2,4-D eklenmiş MS ortamında kültüre alınmış 1 haftalık kotiledondan yeşilimsi kompakt kallus elde etmişlerdir. Kalluslar, 1 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınması ile çok sayıda sürgün üretmiştir. Sürgünler ikinci altkültürden 1 mg/l IBA içeren besi ortamına aktarılarak %100 oranında köklendirilmiştir. Elde edilen iyi köklere sahip bitkiler başarılı bir şekilde doğal şartlara aklimatize edilmiştir. Elde edilen rejenerantlar %80 hayatta kalabilirliği ile sağlıklı, üniform ve donör bitkilerle birebir olduğu belirtilmiştir.

Pirinç ve ark. (2011), Diyarbakır karpuz tipleri; Sürme, Beyazkış ve Karakış için sürgün eksplantları kullanılarak bir mikroçoğaltım protokolü oluşturmuşlardır. *İn vitro* olarak elde edilmiş 5 günlük fidelerden sürgün eksplantları alınıp sürgün rejenerasyon besi ortamında 3 haftalığına kültüre alınmıştır. BA ve karbonhidrat çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonun üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, 0.5 mg/l ve 1 mg/l aralığındaki BA 3 genotipte sürgün uzunluğunu artırmada neredeyse eşit bir şekilde etkili olmuştur. Sakkaroz, BA ile beraber kullanılması ile elde edilen sürgünler ve ortalama sürgün uzunluğu çalışmasında 3 genotip için de en iyi karbonhidrat kaynağı olmuştur. 3 genotip için en yüksek köklenme oranı 1 mg/l IBA ile desteklenen besi ortamı olmuştur. Sürme, Beyazkış ve Karakış sürgünlerinin IBA içeren besi ortamında köklendirilip daha sonra steril kompostta aklimatize edilen genotiplerin en yüksek oranı sırası ile %95, %85 ve %85 olmuştur. Sürme tipi önemli bir ölçüde, Beyazkış ve Karakış tiplerinden daha yüksek ürün ve ortalama meyve ağırlığı üretmiştir, hem direkt tohumdan hem de *in vitro* orjinli karpuzlarda. Esas çözünebilir şekerler, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) ile tanımlanmış ve ölçülmüştür. Fruktoz, Beyazkış'ta (tohumdan), Karakış'ta (in vitro orjinli) en fazla bulunan şeker çeşidi olarak bulunmuştur. Bu araştırma sonucunda Diyarbakır diploid karpuzunun çoğaltımı ve ıslah hatlarının kullanımı için in vitro mikroçoğaltımın kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Khalekuzzaman ve ark. (2012), elit F_1 hibrit karpuz çeşitleri için hızlı bir mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amaçlanarak arazide yetiştirilmiş bitkilerin sürgün uçları kullanılmıştır. En yüksek sürgün ucu büyüme yanıtı, 5 mg/l BA ve 0.1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında gözlenmiştir. Kültürlerin sitokinin ile zenginleştirilmiş MS ortamına transfer edilmesi ile çoklu sürgünler üretilmiştir. 2 mg/l BA bu yönüyle en iyisi olmuştur. Giberellik asidin (GA_3) çoğaltma ortamına eklenmesi sürgün büyümesini daha iyiye götürmüştür. Sürgünler ikinci altkültürden alınıp 1 mg/l IBA içeren besi

ortamında köklendirme oranının %100 olduğu açıklanmıştır. Altkültüre alma sayısı artıkça sürgünler daha çok kök üretmiştir. Rejenere edilen bitkicikler yaklaşık %72 oranında başarı ile aklimatize edilip arazi şartlarında hayatta kalabildiğini rapor etmişlerdir.

Shasthree ve ark. (2014), acı karpuz (*Citrullus colocynthis* L.) için yaprak ve kotiledonlar kullanılarak bir rejenerasyon protokolü gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar 2,4-D ve BAP, TDZ, Kin, Zeatin kombinasyonları ile destekelenen MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları 2 mg/l Kin ve 1 mg/l TDZ içeren MS ortamında kültüre alındığında yüksek oranda kaulogenesis (caulogenesis) ve rejenerasyon (%45) için en iyi eksplant kaynağıdır. 2,4-D ve Zeatin kombinasyonları kotiledon eksplantlarının çoklu sürgün üretiminde %50 başarı ile yanıt görmesinde önemli bir rol oynamıştır. Her kotiledon eksplantı ortalama 3.66 cm uzunluğunda 9.75 adet sürgün verdiğini rapor etmişlerdir.

Ameri ve ark. (2015), bir tohumun farklı kısımları eşit olmayan hormon ve enzim aktivitelerine sahip olduğundan dolayı aynı kültür şartlarına farklı yanıtlar vermektedir. Karpuz tohumunun dolaylı rejenerasyonu için; hipokotil, bazal, merkezi, distal ve periferal bölgeleri(sırasıyla 1, 2, 3,4 ve 5) kullanılarak test edilmiştir. Eksplantlar, 3.5 mg/l BA ve 0.5 mg/l IAA içeren besi ortamında kültüre alınmıştır. Kültür kapları 16/8 fotoperiyot veya karanlıkta kültüre alınmıştır. Her iki haftada bir kallus oluşumu ve rejenerasyon oranı ve oluşan yaprak sayıları 6 haftaya kadar değerlendirilmiştir. En iyi kallus oluşumu ve rejenerasyon oranı sırasıyla karanlıkta ve aydınlıkta gözlenmiştir. Tohum segmentlerinde düzenli bir rejenerasyon şekli bulunmuştur. Rejenerasyon oranı tohumun 2. ve 3. kısımları 4.ve 5. kısımlarla kıyaslandığında daha hızlı olduğu görülmüştür. Periferal kısımların bitkicik rejenerasyon yoğunluğu düşük olarak gözlemlenmiş. Rejenere edilen sürgünler 0.1 mg/l IBA içeren besi ortamında köklendirilmiştir. Elverişli köklere sahip bitkicikler aklimatize edilmek için hidrofonik ve kum saksılara dikilmiştir. En iyi aklimatizasyonun %90 ile hidrofonik kültürden elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Ameri ve ark. (2016), karpuzun (*Citrullus lanatus)* farklı kotiledon kısımları, BA (0.1, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 5 mg/l) ve IAA (0.1, 0.5 mg/l) ile desteklenen besi ortamında kültüre alınarak in vitro organogenesis yapılmıştır. En iyi rejenerasyon, kotiledonun

merkez kısmı kullanılarak ışıkta olurken hipokotil için karanlık ortamı olduğu açıklanmıştır. BA (3.5 ve 5 mg/l) konsantrasyonun yükseltilmesi merkez segmentler için rejenerasyonu artırırken hipokotil segmenlerinde düşüş etkisi göstermiştir. IAA rejenerasyon işini etkin olarak etkileyememiştir. Elde edilen verilerin, kotiledonların proksimal kısımları 3.5 mg/l BA ve 0.5 mg/l IAA içeren besi ortamında 16/8 fotoperiyotta kültüre alındığında in vitro organogenesisin daha yüksek verimlilikte gerçekleştiğini aktarmışlardır.

Cihad ve Solmaz (2019), haploid bitki elde etmek için *Citrullus lanatus* var. *lanatus* ve *Citrullus lanatus* var. *citroides* karpuz tür çeşitlerinde anter kültürü çalışılmıştır. Halep Karası ve Crimson Tide hibrit çeşidi ile *Citrullus lanatus var. citroides* genotipleri olan PI296341 ve PI189225 kullanılmıştır. Anter kültürü uygulamalarında 2 mg/l 2.4-D +90 gr/l sakkaroz ve BAP (1 ve 1.5 mg/l) eklenen MS besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca poliaminlerin etkisini araştırmak için spermidin ve putrescine 500 ve 1000 µM dozlarında birlikte veya ayrı olarak besi ortamına eklenmiştir. 14 farklı besi ortamı kombinasyonu iki farrklı deneyde kullanılmıştır. İlk deneyde çiçek tomurcukları tozlanmadan 1 gün öncesinden toplanmıştır. Toplanan çiçek tomurcukları ve anterler 32 °C'de ve karanlıkta 2 günlüğüne bekletildikten sonra kültüre alınmıştır. İkinci deneyde ise çiçek tomurcukları tozlanmadan 2 gün öncesinden toplanıp ön sıcaklık ile muamele edilmeden kültüre alınmıştır. Anter gelişimi ve kallus oluşumu kullanılan farklı besi ortamı ve genotiplerde çeşitli oranlarda gözlenmiştir. Ancak, ön sıcaklık muamele etkisi ve kallus oluşum oranı *Citrullus lanatus* var. *lanatus* çeşitlerinde daha yüksek olmuştur. Hiçbir bitkide transformasyon rapor edilmemiştir. Spermidin ve putrescine poliaminlerinin etkisi karpuzda anter kültürü ile açıkça gözlemlenmemiş olduğunu rapor etmişlerdir.

2.1.2. İlk Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Steward ve ark. (1958); Reinert (1959), doku kültüründe SE'i ilk kez havuçta (*Daucas caruta L.)* rapor edilmiştir (Kumar ve Loh 2012).

Kato ve Takeuchi (1963); Nakajima (1963); (Wetherell ve Halperin 1963) Olgun havuç bitkisinin organlarından bipolar embriyolar elde etmişlerdir Halperin (1995).

Bonner (1965), Steward ve ark (1958)'nın ortaya atmış olduğu; in vitro embriyogenesis oluşması özellikle besi ortamında kullanmış oldukları hindistan cevizi

sütünün sorumlu olduğunu sistematize ederek somatik embriyogenesisin meydana gelebilmesi için iki şartın yerine getirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Bunlar; özelleşmiş hücrenin diğer hücrelerden ayrılarak tek bir ayrı hücre olarak ve embriyo büyümesi için gerekli besinleri içeren besi ortamına temas edilmesi gerektiğidir. Hindistan cevizinin sıvı endospermi ve at kestanesi bu gerekli besin maddelerini içermektedir. Eğer bu iki şart yerine getirilmezse embriyoların oluşmayacağını aktarmışlardır.

2.1.3. Karpuzda Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Compton ve Gray (1993), 5 karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum ve Nakai) genotipinin (Allsweet, FLAS87-gate, Crimson Sweet, Minilee ve Jubilee II) olgunlaşmamış embriyolarının kotiledonlarını, B5 vitaminleri, 7 g/l agar ve 2,4-D (2.2, 4.2 ve 8.8 mg/l) ve 0.1 mg/l BA veya TDZ içeren modifiye edilmiş MS besi ortamında 3 hafta boyunca karanlıkta inkübasyona alınmıştır. 3-4 hafta sonra 16/8 fotoperiyotta BBD içermeyen MS ortamına aktarılan kotiledon eksplantlarının üzerinde kotiledonları iyi gelişmiş bazı somatik embriyolar gözlenmiştir. Çalışmalarında somatik embriyogenesis için en iyi BBD kombinasyonu 2.2 mg/l 2,4-D + 0.11 mg/l TDZ olmuştur. En yüksek somatik embriyogenesis oranı 18 günlük olgunlaşmamış embriyoların kotiledon eksplantlarında gerçekleşmiştir. Somatik embriyolar BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmiştir. Allsweet, FLAS87-gate, Crimson Sweet, Minilee ve Jubilee II somatik embriyolar için çimlendirme oranları sırasıyla; %33.2, %46.1, %13.8, %42 ve %0 olmuştur. Bitkicikler araziye şaşırtılmadan önce aklimatizasyon işlemi için proMix içeren Magenta-G7 kutularına aktarılmıştır. 3 haftalık aklimatizasyon sürecinden sonra bitkiler araziye aktarılmış ve normal meyve veren erkek ve dişi çiçekler oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Niu ve ark. (2006), karpuzun (*Citrullus lanatus* cv. Zhengkang no.4) kotiledonlarından bitki rejenere etme çalışmaları yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda steril fidelerin öncelikle karanlıkta 3 gün ve daha sonra 16/8 fotoperiyotta da 3 gün kültüre alınması önerilmiştir. Kallus oluşturma oranı kotiledonların üst yüzeyi aşağı gelecek şekilde yerleştirilenler alt yüzeyleri aşağı gelecek şekilde besi ortamında kültüre alınanlarda daha yüksek olmuştur. 2 mg/l BA, 1 mg/l kinetin ve 1 mg/l GA_3 içeren MS besi ortamında en yüksek indüksiyon oranı gerçekleşmiştir. En yüksek embriyogenik kallus oranı 3. altkültürden sonra elde edilmiştir. En iyi köklendirme ortamı (%86.7) 0.3

mg/l IBA ve ardından 0.3 mg/l IAA içeren ½ kuvvetindeki MS ortamı olmuştur. En yüksek somatik embriyogenesis oranı %25 olmuştur. Embriyogenik kalluslardan olgun somatik embriyolar ve bitkiciklerin oluştuğunu aktarmışlardır.

Song ve ark. (2007), çekirdeksiz karpuz çeşidi Hemi2'nin aseptik fideleri karanlıkta 3 gün bekletilip ardından da 3 gün aydınlıkta kültüre alınıp eksplant kaynağı olan kotiledonlar elde edilmiştir. Bu kotiledonlar, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunda eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Somatik embriyogenesis başlatma ve kallus oluşturmak için en iyi ortamın 3 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besi ortamının olduğu gözlenmiştir. Somatik embriyogenesis için en iyi ortam şartının kotiledonların öncelikle karanlıkta ardından da 16/8 fotoperiyotta 1 hafta süresince kültüre alınması ve köklendirme için ise sırasıyla 0.3 mg/l IBA ve 0.3 mg/l NAA bulunduran ½ kuvvetteki MS besi ortamı olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2014), karpuzda (*Citrullus lanatus*) somatik embriyo üretmek için, 3 farklı karpuz çeşidinden 3 farklı eksplant tipi ve BA ile NAA veya 2,4-D kombinasyonlarını kullanmışlar. Kangbingjinxin çeşidin kotiledon eksplantları tüm BBD kombinasyonlarında yüksek oranda (%75.6-%98.9) kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak somatik embriyo oluşum oranı farklı BBD kombinasyonları arasında çeşitlilik göstermiştir. En yüksek somatik embriyo oluşumu 3 mg/l BA ve 0.05 mg/l NAA içeren MS besi ortamından elde edilmiştir. Somatik embriyogenesis Kangbingjinxin, Zaojia 8424 ve Heimeiren arasında farklı olup oluşum oranları sırası ile %46.2, %34.1 ve %15.7 olmuştur. Her üç eksplant tipi olan kotiledon, kotiledon çeneği ve hipokotilde kallus oluşum oranları sırasıyla; %88.9, %96.7 ve %98.9 olmuştur. Ancak kotiledon ve kotiledon çeneği daha çok embriyogenik kallus oluştururken hipokotil embriyogenik olmayan kallus oluşturmuştur. Somatik embriyo oluşum oranı kotiledon çeneğinde %62 iken kotiledonda yaklaşık %46 olmuştur. Hipokotil eksplantından hiç bir somatik embriyo oluşmamıştır. Eksplant başına üretilen somatik embriyo sayısı, kotiledon çeneğinde 2.3 iken bu sayı kotiledonda 6 adet ile daha çok fazla olduğu bildirilmiştir.

Ramakrishna ve Shasthree (2016), acı karpuzda (*Citrullus colocynthis L.)* somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak; yaprak, gövde (stem) ve kotiledonları kullanmışlardır. BBD olarak 2,4-D, NAA, GA_3 ve BAP konsantrasyon ve kombinasyonlarını ve besi ortamı olarak ta MS ortamı

kullanılmış. En başarılı somatik embriyo oluşumunu %25 ile nodüler embriyogenik kallustan (%85) elde ettiklerini ve torpido ve kotiledon fazındaki emriyoların bitkiciklere dönüştüğünü ve *in vivo* şartlarda araziye aktarıldığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak etkili ve başarılı bir somatik embriyogenesis rejenerasyon protokolü geliştirdiklerini bildirmişlerdir.

Vinoth ve Ravindhran (2016), Arka Manik karpuz (*Citrullus lanatus)* çeşidi için basit ve etkili bir somatik embriyogenesis sistemi geliştirmişlerdir. Embriyogenik kallus, 0.54 µM 2,4-D ve 0.5 mg/l TDZ ile desteklenen MS ortamında kültüre alınan in vitro yetiştirilen 20 günlük fidelerin yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. En yüksek embriyogenik kallus oluşum oranı %96.8 olmuştur. Proembriyogenik yığını şeklindeki embriyogenik kalluslar embriyo olgunlaştırma ortamına transfer edilmiş, globular safhadaki somatik embriyoların kotiledon safhasındaki gelişimi eş zamanlı olmadan gerçekleşmiştir. Eksplant başına en fazla somatik embriyo sayısı yaklaşık 16 adet ile 0.54 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l TDZ ve 30 g/l sakkaroz ile desteklenen MS besi ortamından elde edilmiştir. Kotiledon safhasındaki somatik embriyoların bitkiciklere dönüşümü BBD içermeyen farklı kuvvetlerdeki (1/4, 1/2 ve 1/1) MS besi ortamlarında test edilmiştir. En yüksek çimlenme frekansı (%91.5) ve hayatta kalma (%82.1) oranı 1/1 kuvvetindeki MS ortamında başarıldığını aktarmışlardır.

2.1.4. *Cucurbitaceae* Familyasında Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Jelaska (1972), kabakta (*Cucurbita pepo L.)* ilk somatik embriyogenesisi gerçekleştirmiştir. 1 cm uzunluğundaki kotiledon ve hipokotiller 25 ml MS besi ortamı içeren test tüplerinde kültüre alınmış. %3 sakkaroz, %0.9 agar ve 10 ve 1 mg/l IBA, 0.3 mg/l 2,4-D , 0.3 mg/l 2,4-D + %10 otoklavdan geçirilmiş karpuz suyu, 0.3 mg/l 2,4-D + 2 g/l maya ekstraktı, 0.3 mg/l 2.4-D + 0.1 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA + 13.5 mg/l adenin, 1 mg/l 2,4-D + kazeine hidrolizat kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınmış. 1 mg/l IBA içeren MS ortamından kallus ve bitkicikler meydana gelmiştir. Bitkiciklerin ve köklerin farklılaşması 0.3 mg/l 2,4-D + %10 karpuz suyu içeren besi ortamında oluşmuş. 1 mg/l IBA içeren besi ortamında kalp şeklinde, torpido ve kotiledon safhasında embriyolar oluşmuştur. 1 mg/l IBA içeren besi ortamında çomak haline gelen

dokudan adventif embriyo oluşmuştur. Elde ettikleri dokuları bir yıl boyunca her iki ayda bir altkültüre alarak kallus, embriyo ve bitkicikler elde etmeye devam etmişlerdir. Kabakta embriyo oluşumu üzerine dışsal BBD'den ziyade dokunun fizyolojik şartları, kültür yaşı ve besi ortamı bileşenlerinin etkili olduğunu belirtmiştir.

Jelaska ve ark. (1985), *Cucurbita pepo L.* hipokotil eksplantları aseptik olarak, IAA tek başına veya indole-3-ethanol, tryptophol arabinoside ve tryptophol glucoside ile birlikte katılmış olan katı MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Embriyogenik kallus ve adventif kökler eksplantların üzerinde gelişmiştir. Oksin veya oksin türevleri içermeyen besi ortamında kültüre alınan hipokotil kısımları ne embriyogenik doku oluşturmuş ne de besi ortamında yaşayabilmiştir. Bir kaç eksplant indole-3-ethanol'e nispeten IAA'ya yanıt vermiştir. Hipotil kısımlarının proliferasyonunda arabinopyranosid gluko-pyranositten daha etkili olmuştur. Embriyogenik kallus yukarıda bahsedilen oksin ve oksin türevleri içeren besi ortamında oluşmuştur. Seçilen kallus hatları 3 yıldan daha fazla süre boyunca kültürü sürdürülmüş ve embriyoid üretimi devam etmiştir. Indol-3-ethanol ve IAA aksilar ve tepe tomurcuğu kültürü ile üretilen bitkiciklerin klonal çoğaltımı için uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Oridate ve Oosawa (1986), somatik embriyolar ve bitkicikler kavunun kotiledon kalluslarının süspansiyon kültüründen oluşturulmuştur. Olgun kavun (*Cucumis melo L.)* tohumlarından alınan kotiledonları 2,4-D ve BA içeren agarlı MS ortamında kültüre alınmıştır. 3 haftalık kallusları hormonsuz sıvı MS ortamına aktarmışlardır. Somatik embriyolar ve bitkicikler 2-3 hafta içinde sıvı MS ortamında gözlenmiştir. Kallusların kültüre alındığı 1 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l BA içeren agarlı MS ortamı embriyogenesis için en uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Trulson ve Shahin (1986), hıyar (*Cucumis sativus L.*) çeşitleri ve farklı ıslah hatlarının kotiledon ve kök eksplatlarından, ve kokulu kavunun kotiledon eksplantlarından bitkiler rejenere etmişlerdir. 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren MS besi ortamında somatik embriyogenesis başlatılmıştır. Embriyolar 2,4-D içermeyen MS besi ortamında olgunlaştırılıp hormonsuz MS besi ortamında normal bitkiye dönüştürülmüştür. Ayrıca, modifiye edilmiş domates protoplast kültürü protokolü ile hıyar bitkilerini rejenere ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kwack ve Fujieda(1988), *Cucurbita moschata*'da somatik embriyo üretimi

gerçekleştirmek üzere döllenmemiş ovül kültürü ve histolojik gözlemleri yapılmıştır. Anterlerdeki ovaryumlardan kesilen ovüller ½ kuvvetindeki sıvı MS besi ortamında 5°C'de 2 gün boyunca kültüre aldıkları ovüllerin yaklaşık %17'si somatik embriyo üretmiştir. Proembriyo, globular, kalp ve kotiledon safhalarını gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri embriyolar arasında sadece bir kaç tanesi normal morfolojik yapıda olduğu ve geriye kalanlarda ikinci embriyo ve anormal kotiledonlar gözlenmiştir. Elde ettikleri bitkilerin diploid (2n=40) veya tetraploid yapıda olduklarını belirtmişlerdir. Yaptıkları histolojik ve sitolojik çalışmalarına göre *Cucurbita moschata'*nın döllenmemiş ovüllerden elde ettikleri embriyoların tek nüseller hücrelerinden direkt olarak geliştiğini bildirmişlerdir.

Cade ve ark. (1990), hıyar (*Cucumis sativus L.*) kotiledonlarından somatik embriyogenesis üzerine çeşitli doku kültürü besi ortamlarını test etmek için 2 çalışma yürütmüşlerdir. İlk 3 haftadan sonra ilk kültür başlatma ortamından kültürleri 2,4-D + Kinetin bulunan ortamda veya içinde NAA + Kinetin bulunan ikinci gruba aktarılmıştır. İlk çalışma olan Embriyo başlatma için en iyi besi ortamı, 1-2 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l kinetin içeren MS ortamı olmuştur. İkinci çalışmada ise embriyolar çok daha normal şekilde gelişmişler ve 3.haftadan sonra ilk kültür başlatma ortamından çıkarılıp 3 haftalığına 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l kinetin içeren MS ortamına alınan eksplantlar, 2,4-D içeren MS ortamında bırakılan emriyolardan daha çok bitkicikler geliştirilmiştir. Globular embriyoların ilk 3 haftadan sonra 2,4-D içeren besi ortamında gözlemlenmiş, yaprak ve köklere sahip bitkicikler ise 9 hafta aradan sonra meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Punja ve ark. (1990), *Cucumis sativus*'un 6 adet homozigot çeşidi veya F_1 hibritleri, 2,4-D + BA, NAA + BA, NAA + zeatin veya NAA + kinetin kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. 6-8 hafta kültüre süresinden sonra kotiledon, yaprak ve petiol eksplantlarının rejenerasyon frekans aralığı sırasıyla %0, %38, % 0-75 ve %14-96 olduğu belirtilmiştir. Rejenerasyon için sadece bir tane kallusların altkültürü için hormonsuz MS büyüme ortamı gerekmiştir. Optimal rejenerasyon için eksplantların 2-3 hafta için karanlıkta öninkübasyona alınması gerekli olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek bitkicik oluşma frekansı petiol eksplantlarının 0.93 mg/l NAA + 0.56 µM BA, 0.93 mg/l NAA + 1 mg/l zeatin, 1.1 mg/l 2,4-D + 1.13 mg/l BA içinde bulunan besi ortamlarında meydana gelmiştir. Seraya transfer edilen bu bitkilerin yaklaşık %80'i hayatta kalmayı başarmışlar ve çiçeklenip meyve tutmuşlardır.

F_1 hibriti %91 ile en yüksek frekansı 1.1 mg/l 2,4-D ve 1.13 mg/l BA içeren besi ortamında vermiştir. NAA + BAA ve NAA + Zeatin içeren besi ortamında hem embriyogenesis hem de organogenesis meydana gelirken 2,4-D + BA ortamında sadece somatik embriyogenesis oluşumu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kotiledon eksplantı %7 ile en düşük bitkicik oluşum frekansını vermiştir. *C. Sativus* var. hardwickii ile *C.sativus* var hardwickii'nin F_1 hibriti bitkicikleri, NAA + zeatin ve NAA + kinetin içeren besi ortamlarında %15 ila %65 frekanslarında somatik embriyogenesis ile rejenere edilmiştir. Sürgünler *C. metuliferus'*un kotiledon ve yaprak eksplantları 1.3 mg/l IAA + 1.13 mg/l BA, *C.melo*'nun yaprak ve petiol eksplantları ise 0.93 mg/l NAA + 0.56 mg/l BA içeren besi ortamından elde edilmiş ancak bitkicikleri sadece *C.melo*'dan elde ettiklerini aktarmışlardır.

Chee (1991), Doku kültürü ile yazlık kabak çeşidi YC60'ın (*Cucurbita pepo L.)* 2 mm'lik sürgün uçlarını kültüre alarak somatik embriyo elde etmiş. 1.2 mg/l 2,4-5 triklorofenoksiacetik asit, 0,8 mg/l BAP ve 0,1 mg/l kinetin içeren MS besi ortamını kullanmış. Meydana gelen olgunlaşmamış embriyolar 0,05 mg/l NAA ve 0,05 mg/l kinetin içeren MS ortamında bitkiciklere dönüşmüştür. Elde edilen bitkiler normal olarak çimlenebilen ve çekirdekli meyveler oluşturan morfolojik olarak normal göründüklerini aktarmıştır.

Oridate ve ark (1992), 18 adet kavun (*Cucumis melo L.)* tohum çeşidinde somatik embriyogenesiste önemli farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle Earl's favorite ve Barnett yüksek miktarlarda somatik embriyo üretirken bazılarında ya hiç embriyo oluşmamış veya embriyogenik yanıtları zayıf kalmıştır. Kültivarların melezlemesiyle elde edilen F_1 çeşitlerinin çoğu somatik embriyo oluşturmuştur. Yüksek potansiyelli ebeveynleri ile kıyaslandığında somatik embriyogenesis frekansı düşük çıkmıştır. Yanıt veren üstün çeşitlerden düşük dereceli çeşitlere somatik embriyogenesis frekansının transferini kanıtladıklarını rapor etmişlerdir.

Gray ve ark. (1993), erkek-steril A147 çeşidi (*Cucumis melo L.*) için yüksek frekanslı somatik embriyogenesis protokolü geliştirmişlerdir. Oksin 2,4-D ve sitokininler; BA, kinetin, TDZ veya 2iP kombinasyonları içeren embriyo başlatma ortamında tohum kotiledonlarının yarısı eksplant olarak kültüre alınmıştır. 5 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l TDZ içeren MS embriyo olgunlaştırma ortamı eksplant başına 3.3 somatik

embriyo ile en iyisi olduğu görülmüştür. Kültürler, embriyo başlatma ortamında 1 veya 2 hafta (%30 ve %33) inkübe edildiğinde 3 veya 4 hafta inkübe edilenlere göre daha fazla embriyo oluşturmuştur. Ancak eksplant başı embriyo sayısında 2 haftalık inkübasyon süresi 1 haftalık inkübasyon süresinden 2.9 kat daha iyi olduğu tespit edilmiştir. 1 haftalık karanlık inkübasyon sürecinden sonra 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyodunda kültüre alınan kültürler, 2 hafta ve 3 hafta veya hiç karanlık tutulmayan kültürlere göre daha çok yanıt veren eksplantlar üretmiştir. Sakkaroz konsantrasyonun embriyo başlatma ve embriyo geliştirme ortamlarının üzerinde çok önemli etkisi olmuştur. Embriyo başlatma ortamında embriyogenik eksplant elde etme üzerinde en iyi sakkaroz oranının %3 olduğu, ancak embriyo başlatma ortamında %3, embriyo geliştirme ortamında ise %3 ve %6 sakkaroz oranları eksplant başı embriyo (8.5 ve 11.9) üretmede diğer muamelelerden çok daha fazla embriyo üretmiştir. Optimal muameleleri 51 adet başka varyetelerle test etmişlerdir. Bütün varyeteler eksplant başına 0.1-20.2 embriyo ile %5 ile %100 arasında yanıt verdiğini bildirmişlerdir.

Lou ve Kako (1994), hıyarın (*Cucumis sativus L.)* 7 tane çeşidinin kotiledon, ilk yaprak ve boğum dokularının embriyogenik kapasiteleri araştırılmıştır. Test edilen çeşitlerin somatik embriyogenesis frekansları farklılık göstermiştir. Fushinarimidori çeşidi kotiledon veya ilk yaprak eksplantlarından en çok embriyo üreten çeşit olmuştur. Kotiledon veya ilk yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar boğum eksplantlarından elde edilen kalluslardan daha çok embriyo üretmiştir. Somatik embriyolar Aonaga F_1 çeşidinin boğumlarından üretilmiştir. Fushinarimidori çeşidinin kotiledon eksplantının %6 ve %9 sakkaroz içeren besi ortamında embriyogenik kallus oluşturma frekansı %90'dan fazla olmuştur. Sakkarozun %12 oranında ortamda bulunması kallus oluşumunu ve büyümeyi düşürmesine rağmen somatik embriyolar en çok yüksek düzeyde sakkaroz (%9 ila %12) içeren besi ortamında meydana gelmiştir. Somatik embriyolar, %0.5 aktif kömür ile desteklenen sıvı besi ortamında çimlendirilip %1 sakkaroz içeren yarı katı besi ortamda iyigörünümlü ve sağlıklı bitkiciklere dönüştüğünü belirtmişlerdir.

Gonsalves ve ark. (1995), 6 adet yazlık kabak çeşitlerinin (*Cucurbita pepo L.*) çimlendirilmiş veya çimlendirilmemiş tohumların kotiledonlarından somatik embriyolar elde etmişlerdir. Kullanılan çeşitler; zucchini, President, Senaca Zucchini ve Jade adlı ticari hibrit çeşitler; ticari olmayan kendilenmiş hatlar Caserta inbred 557311 ve iki sarı yazlık kabak hibritleri olan Dixie ve Seneca Butterbar. SE, 5 mg/l 2,4-D içeren MS besi

ortamında başlatmışlardır. Somatik embriyolar 0,05 mg/l NAA ve 0,05 µM kinetin içeren ortamda çimlendirmişlerdir. Seneca Butterbar kotiledonlarının %61'i 10 haftadan sonra somatik embriyolar meydana getirmişlerdir. Kültüre alınan eksplantlarının %7'si bitkicik oluşturmuştur. Eksplant başı bitkicik elde etme oranı %3 olarak belirtilmiştir. Farklı zaman periyodu belirlenen Caserta inbred 557311kotiledonlarının tamamı 11-17 hafta sonrasında somatik embriyo oluşturmuştur. Ancak bitkiciklerin üretimi Seneca Zucchini için 13 hafta, Caserta inbred 557311 için ise 15 hafta optimal kültür süreci ile ortalama explant başı bitkicik üretimi 4.5-9.3 adet olmuştur. Seneca zucchini eksplantları %90, Caserta inbred 557311 eksplantları ise %70 oranında embriyo üretmişlerdir. Altı varyetenin tümünden bitkiler elde edilmiştir. Elde ettikleri yüksek rejenerasyon oranında, yapmış oldukları rejenerasyon protokolünün etkili olduğunu ve bu protokolün yazlık kabaklarda (*Cucurbita pepo L.*) transformasyon çalışmaları için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Taner ve Yanmaz (2003), Kuşçular, Yuva ve Kırkağaç kavun çeşitleri için *in vitro* somatik embriyogenesis ve kallus oluşumunu gerçekleştirmek üzere, çeşitli bitki kısımları (kotiledon ve hipokotil) oksin ve sitokinin (2,4-D, NAA ve Kinetin) kombinasyonlarını içeren farklı MS kuvvetlerinde etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmada somatik embriyo ve kallus üretimi üzerinde oksin-sitokinin oranının, kullanılan eksplant çeşidinin, besi ortamı bileşiminin ve genotipinin etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Somatik embriyoların %93'ünün kallus yoluyla kotiledon eksplantından, hipokotilden ise %7 oranında meydana gelmiştir. En çok embriyo elde ettikleri çeşit, 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin ile desteklenen ½ kuvvetteki MS besi ortamında kültüre alınan Kuşçular çeşidi olmuştur. Kuşçuları sırasıyla %18.6 ile Yuva ve %3.1 ile Kırkağaç takip ettiğini bildirmişlerdir.

Balen ve ark. (2004), *Agrobacterium rhizogenes* ile aşılanmış 8 günlük kabak (*Cucurbita pepo L.*) fidelerinden kesilen kotiledonlar hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Katı besi ortamında 3 yıldan daha fazla kültüre alınmakta olan Cp1, Cp2 ve Cp31 ağsı kök hatları doğal olarak üzerlerinde embriyo gibi yapılar bulunan kalluslar meydana gelmiştir. 5.7 pH oranına sahip besi ortamının otoklav süresinin 30 dk.'ya yükseltilmesi kallus proliferasyonun sıklığını artırmıştır. Ayırılan kalluslar proliferasyona devam edip anormal morfolojide embriyolar oluşturmuştur. IAA ve BA kombinasyonun Cp31 kallus hatında organogenesis ve embriyogenesisin üzerinde olumlu

etkilerinin olduğunu aktarmışlardır.

Urbanek ve ark. (2004), Styrian kabağının (*Cucurbita pepo L. subsp pepo var. styriaca Greb)* kotiledonları, 3 mg/l NAA ve 0.83 veya 5 mg/l NAA ve 3 mg/l BA içeren katı MS ortamında kültüre alınarak somatik embriyo elde edilmiştir. 5 mg/l NAA ve 2.33 mg/l IAA içeren MS besi ortamında kallus oluşumu daha yüksek olmuştur ancak embriyogenik yanıt düşük konsantrasyonlarda (3 mg/l NAA ve 1 mg/l BA) daha yüksek olmuştur. Embriyo oluşumu için gereken zamanın besi ortamına bağlı olmamıştır. Globular safhadaki embriyolar, 1 mg/l GA_3, 0.1 mg/l NAA, 2 mg/l IAA kombinasyonları ve hormonsuz besi ortamlarında olgunlaştırılmak üzere kültüre alınmıştır. En iyi çimlenme 2 mg/l IAA içeren besi ortamında gerçekleşmiştir. Olgunlaşıp aktarmaya elverişli hale gelen bitkicikler 9 10 hafta içerisinde araziye transfer edilmiştir. Rejenere edilen bitkiler arazide verimli çiçekler oluşturup meyve tuttuğunu bildirmişlerdir.

Hongyan ve ark. (2005), Hetao kavun (*Cucumis melo L.)* çeşidinde somatik embriyogenesisin genel faktörleri araştırılmıştır. Hetao çeşidinin kotiledonları kültüre alınmış ve somatik embriyo gözlemlenmiş. Çalışma sonuçları 2 mg/l 2,4-D ile 1 mg/l BA ve 60 mg/l şeker ile desteklenen MS besi ortamında en yüksek rejenerasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. Günlük kotiledon eksplantları bir hafta karanlıkta kültüre alınmış sonraki hafta ise fotoperiyoda alınmış ve ardından embriyo geliştirme ortamında transfer etmiş ve daha fazla olgun embriyo meydana gelmiştir. Somatik embriyolar eksplantın meristem vaskülerinden, adventif kök veya eksplantın yüzeyinde oluşan kallusların içinden veya yüzeyinden oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Naderi ve ark. (2011), İran'ın spesifik bir kavun çeşidi olan Khatooni'de somatik embriyogenesis çalışmışlardır. 6 günlük fidelerden alınan 3 farklı farklı eksplant tipi (kotiledon, kotiledon petiolu ve hipokotil) ve BBD olarak da BAP (0 ve 0.1 mg/l) ve 2,4-D (0, 2.5, 5 ve 7.5 mg/l) kullanmışlardır. Somatik embriyogenesis üzerinde en etkili BBD kombinasyonu 0.1 mg/l BA ve 5 mg/l 2,4-D olurken en yüksek somatik embriyogenesis potansiyeli gösteren eksplantın kotiledon petiolu olduğunu rapor etmişlerdir.

Usman ve ark. (2011), Ticari hıyar çeşitleri embriyogenesis, bitki rejenerasonu, BBD ve somatik dokular için araştırılmıştır. En fazla kallus oluşumu sırasıyla %94.16 ve %76 ile 2 mg/l 2,4-D, 1.5 mg/l NAA ve 1.5 mg/l BAP ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan yaprak disk eksplantlarında gözlenmiştir. 4 mg/l BAP + 0.75 mg/l NAA

içeren besi ortamında kültüre alınan tohum kotiledonları %77 ile maksimum kallusu oluşturmuştur. En yüksek (5 mg/l) 2,4-D ile yaprak disklerinde oluşan kallus en çok %23 embriyo oluştururken 5 mg/l BAP ve 5 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ise sırasıyla %14 ve %12 oranında sürgün oluşturmuştur. Elde edilen sürgünler MS besi ortamında köklendirilmiş ve saksılara dikilip aklimatize edildikten sonra bitkiciklerin araziye şaşırtıldığını rapor etmişlerdir.

El-Sayed el-absawy ve ark. (2012), *Cucumis sativus L. cv.* Faris bitki rejenerasyonu için etkili bir somatik embriyogenesis protokülü geliştirmişlerdir. Kültürün olgun tohumları, kotiledonları ve sürgün uçları 30 mg/l sakkaroz, %0,8 agar, 2,4-D ve kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmış ve embriyogenik kallus elde etmişlerdir. %94 ile maksimum embriyogenik kallus oluşumu 1 mg/l 2,4-D ve %92 oranındaki embriyogenik kallus oranı ise 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Somatik embriyolar, 5 mg/l 2,4-D (%33) ve 0,5 mg/l NAA (%27) ile desteklenen MS ortamında kültüre alınan olgun tohum eksplantlarında 17 hafta sonra gözlenmiştir. 2 mg/l 2,4-D (%10) ve 0,5 mg/l NAA(%25) ile desteklenen MS ortamındaki kotiledonlar ise 18 haftadan sonra somatik embriyolar gözlenmiştir. %40 en yüksek SE oranı, 2 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l NAA (%30) sürgün ucu eksplantlarından 13 hafta sonra elde etmişlerdir. Olgun tohum ve kotiledon kalluslarından adventif sürgün rejenerasyonu 8 hafta sonra 0,5 mg/l BA ile destelenmiş MS ortamında gerçekleşmiştir. In vitro rejenerasyon ile elde ettikleri iyi köklere sahip bitkileri önce seraya ardından da toprağa başarılı şekilde aktarmışlardır.

Thiruvengadam ve ark. (2013), Somatik embriyogenesis yoluyla gherkin (*Cucumis anguira L.)* rejenerasyonu için etkili bir hücre süspansiyon kültürü protokolü geliştirmişlerdir. 0.88 mg/l 2,4-D ve 0.22 mg/l kinetin ile desteklenmiş MS besi ortamında yaprak eksplantlarından elde edilmiş kalluslar kültüre alınmıtırş. En yüksek SE oranı (%33.5), 0.44 mg/l 2,4-D ile desteklenen MS ortamında 3 hafta kültüre alınan kültürlerde gözlemlenmiştir. Somatik embriyoların ontogenik çalışmaları, somatik embriyo olacak hücrelerin 5 hafta içerisinde küre şeklindeki proembriyolara bölünüp ardından globular şeklini aldıktan sonra kalp şekline ve daha da farklılaşıp uygun bir şekilde torpido ve kotiledon safhalarını geçirdiğini açığa çıkardığını belirtmişlerdir. Embriyo gelişimi eşzamansız ve kuvvetli bir şekilde 2,4-D konsantrasyonundan etkilenmiştir. 0.44 mg/l 2,4-D ve 0.17 mg/l L-glutamine ile desteklenmiş olan MS sıvı ortamı yüksek oranda

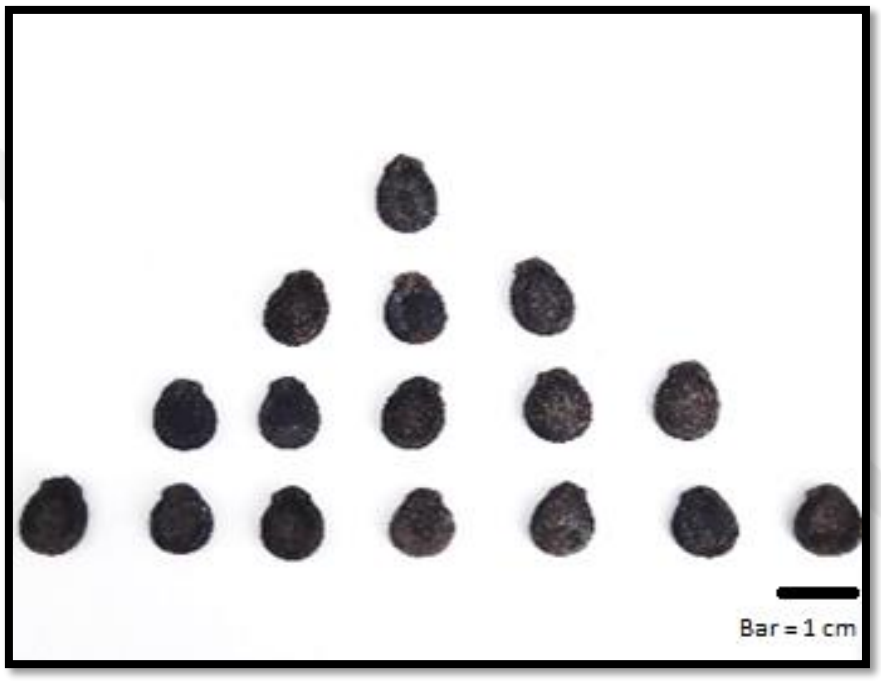
(%44.5) somatik embriyo üretmede etkili olmuştur. Kotiledon safhasındaki somatik embriyolar hormon içermeyen sıvı MS besi ortamına 7 günde olgunlaşmasının gerçekleşmesi için transfer edilmiş. Süspansiyonlarda 2,4-D'nin eksikliği somatik embriyo olgunlaşmasını artırıp anormalliği azalttığını ifade etmişlerdir. Sakkarozun kallus oluşturma, embriyo olgunlaştırma ve çimlendirme için en iyi karbon kaynağı olduğunu bulmuşlar. 0.13 mg/l ABA, %2 sakkaroz, %0.2 gelrite içeren 1/10 katı MS ortamına aktarıldığında nispeten bir kaç embriyo kök ve sürgün oluşturmuştur. Yaklaşık olarak somatik embriyoların %15'i 2 hafta içinde morfolojik olarak normal ve verimli bitkilere dönüşmüştür. Rejenere edilen bitkicikler başarılı bir şekilde aklimatize edilmiş ve %80 başarı ile araziye aktarılmıştır. Bu rejenerasyon protokolünün başarılı bir şekilde embriyo üretimi, gelişimi ve bitkiciklerin dönüşümünü garanti ettiğini bildirmişlerdir.

Raji ve ark. (2018), Mashhadi ve Eivanaki tarafından kokulu kavun (*Cucumis melo L)* çeşitleri için yeni bir direkt somatik embriyogenesis yolu ile in vitro rejenerasyon protokolü rapor edilmiştir. Daha önce hiç denenmemiş 3 fitohormonların kombinasyonları olan NOA + TDZ, NOA + BAP ve 2,4-D + 4-CPPU içeren MS besi ortamında 4-8 günlük kotiledon, hipokotil ve tohum eksplantları kültüre alınmasıyla somatik embriyo elde edilmiştir. Embriyogenesis hipokotil ve 8 günlük kotiledonlardan daha çok 4 günlük kotiledon (%11) ve tohumlarda (%12) gerçekleşmiştir. En iyi sonuç %48 ile 0.4 mg/l NOA + 0.2 mg/l BAP kombinasyonundan elde edilmiştir. Eksplant tipi kallus ve sürgün oluşumu üzerinde önemli farklılıklar göstermiştir. En yüksek kallus oluşumu (%54) 8-günlük kotiledon üzerinde meydana gelirken, en yüksek sürgün oluşumu 4 günlük kotiledondan (%14) meydana gelmiştir. En yüksek kök oluşumu (%12) ise 4 günlük hipokotil ve 8 günlük kotiledondan oluşmuştur. Genotipin embriyogenesis üzerinde etkisi gözlenmiştir. Eivanaki çeşidinin oluşturduğu embriyo sayısı Mashhadi'ninkinden çok daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitkisel materyal olarak, Diyarbakır karpuzu (*Citrullus lanatus cv. Sürme)* Sürme tipinin 1 yıllık olgun tohumları kullanılmıştır (Şekil 3.1). Tohumlar, Diyarbakır karpuzu Sürme tipinin yoğun olarak yetiştiriciliğinin yapıldığı Diyarbakır merkez ilçesine bağlı Erimli köyünden temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Diyarbakır karpuzu Sürme tipine ait 1 yıllık olgun tohumlar

3.1.1. Olgun Sürme Tipi Karpuz Tohumlarının Çimlendirilmesi

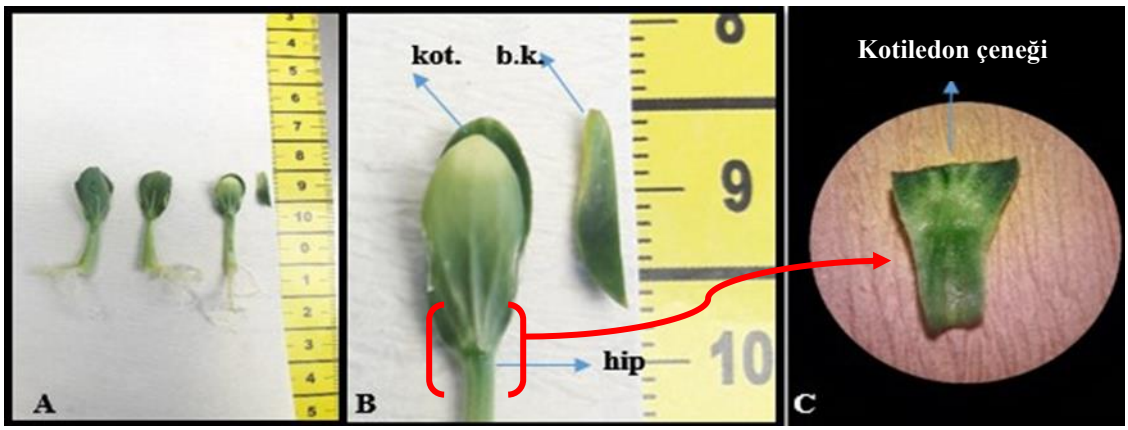
Tohumlar, yüzey sterilizasyon işleminden sonra içinde %3 sakkaroz bulunan ve %0.7 agar ile katılaştırılmış MS besi ortamı bulunan Magenta GA-7 kültür kaplarında kültüre alınmıştır. Eksplantlar 3 gün tam karanlıkta bekletilmiş daha sonra 5 günlük eksplantlar için 2 gün, 20 günlük eksplant için ise 17 gün boyunca 16 s aydınlık ve 8 s karanlık ortamda 25±2 °C'de çimlendirilmeye bırakılmıştır (Şekil 3.2). Her Magenta GA-7 kültür kabında ortalama 5 adet tohum kültüre alınmıştır.



Şekil 3.2. *In vitro* BBD içermeyen MS ortamında tohum çimlendirilmesiyle elde edilen Sürme tipi karpuz fidesi, A (5 günlük), B (20 günlük)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri

Kotiledon, hipokotil kotiledon çeneği, kotiledon kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Bu eksplant tipleri, olgun tohumların BBD içermeyen Murashige ve Skoog'un (1962) besi ortamında *in vitro* çimlendirilerek elde edilen fidelerden sağlanmıştır.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan eksplant tiplerine ait eksplant kaynağı (**A**), **kot**: kotiledon **b.k:** Bölünmüş kotiledon (**B**) **hip:**hipokotil (**B**), radyal kısımı çıkarılmış kotiledon çeneği (**C**)

I. Deney I için: kotiledon kısımları; kotiledondan yaklaşık 25 mm^2 olacak şekilde kesitler alınarak eksplantlar hazırlanmıştır. Bu deneyde tüm kotiledonlar *in vitro* çimlendirilen olgun tohumların 20 günlük fidelerinden elde edilmiştir (Şekil 3.2 / B).

II. Deney II için: kotiledon; uzunlamasına iki eşit parçaya bölünerek yaklaşık 1.0 cm boyutunda, hipokotil; 0.5 ila 1.0 cm boyutunda ve kotiledon çeneği; 0.5 ila 1.0 cm boyutunda ve radiyal kısım çıkarılarak eksplantlar hazırlanmıştır. Bu deneyde tüm eksplantlar *in vitro* çimlendirilen olgun tohumların 5 günlük fidelerinden elde edilmiştir (Şekil 3.2).

3.2. Yöntem

Bu tez çalışması, Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında 2020 yılıda yürütülmüştür.

3.2.1. Sterilizasyon Teknikleri

3.2.1.1. Cam Malzeme ve Ekipmanlarının Sterilizasyonu

Kullanılan petri, beher, balonjoje, erlenmayer vb. cam malzemeler 180 °C'de 2 saat boyunca etüvde bekletilerek ısı ile sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.1.2. Metal Malzeme ve Ekipmanlarının Sterilizasyonu

Kullanılan pens çeşitleri, bisturi sapları vb. metal malzemeler %96'lık ethanol ile silindikten sonra alüminyum folyolara sarılarak etüvde %180 °C sıcaklıkta 2 saat boyunca bekletilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.1.3. Kağıt Malzemelerin Sterilizasyonu

Kabinde çalışma esnasında kültür hazırlamada çok amaçlı olarak kullanılan filtre kağıtları kağıtlar belirli ebatlarda kesilip parşömen kağıtları ile sarılıp etüvde 150-180 °C sıcaklıkta 2 saat bekletilerek sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. Kültür Kaplarının Sterilizasyonu

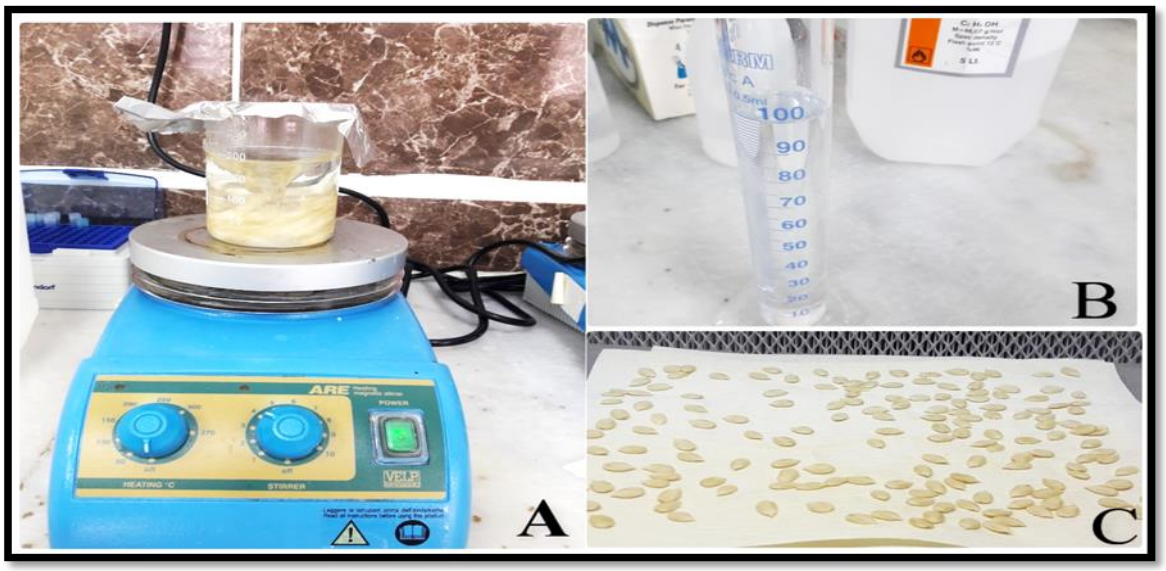
Çalışmada kullanılan Magenta GA-7 kültür kapları otoklavda 121°C sıcaklık ve 1.5 atm basınç altında 20 d bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.5. Besi Ortamının Sterilizasyonu

Hazırlanan besi ortamı erlenmayerlere veya vida kapaklı otoklavlanabilir cam şişelere dağıtıldıktan sonra otoklava alınıp 20 d boyunca 121 °C'de ve 1.5 atm basınçta bekletilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.1.6. Tohumların Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan Sürme tipi karpuz tohumlarının kabukları manuel olarak çıkarılmış kabuksuz tohumlar 3-5 d boyunca çeşme suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra tohumlar 100 ml %70'lik etanol içerisinde 60 s çalkalanmıştır ve ardından 3 kez steril distile su ile çalkalanmıştır. Tohumlar bu defa da 100 ml %5 NaOCl 1 veya 2 ml Tween-20 eklenen çözeltide 5 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra tohumlar steril distile su ile 5 dk çalkalanmıştır, bu işlem 5 kez tekrar edilmiştir. Tohumlar kurutulmak üzere steril hava akışlı kabin içerisinde steril kağıtlar üzerinde kurutulmaya bırakılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tohumların sterilizasyon işlemleri. A: Tohumların sterilant içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılması, B: %70'lik etanol hazırlanması, C: Tohumların sterilizasyon işleminden sonra steril kabin içerisinde kurutulmaya bırakılması.

3.2.2. Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları

Çalışmada hazır MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamı kullanılmıştır. MS besi ortamının hazırlanmasında çözücü olarak steril distile su kullanılmıştır. MS besi ortamı sakkaroz, agar ve BBD ile desteklenmiştir. pH derecesinin ayarlanmasında 1 N HCL ve 1 N NaOH kullanılmıştır. Besi ortamı sterilizasyon işleminden sonra kültür hazırlama odasında petri, Magenta GA-7 ve cam kavanozlara istenilen hacimlerde dağıtılmıştır. Genellikle petri veya Magenta başına 40 ml besi ortamı olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. Tüm kültür işlemleri UV lamba yerleştirilmiş (kültür çalışmaları yapılmadan önce 3 saat çalıştırılmıştır) kültür hazırlama odasında bulun steril hava akışlı

kabinde gerçekleştirilmiştir. Kültür işlemlerinden önce kabin %70'lik etanol ile silinmiş ve kabinin UV lambası en az 20-30 d arasında çalıştırılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra kültürler çalışmanın amacı doğrultusunda tam karanlık veya 16 s ışık/ 8 s karanlık fotoperiyotlu, ışık yoğunluğu 50 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (beyaz flouresan) ve ortam sıcaklığı 25±2 °C olan kontrollü büyüme odasında inkübasyona alınmıştır. Köklendirilen bitkicikler steril torf ortamına aktarılıp bu büyüme odasında aklimatize edilmiş ve ardından da alıştırma odasında belirli bir süre boyunca sera şartlarına bırakılmıştır. Sera şartlarından alınan bitkicikler araziye aktarılmıştır.

3.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması

Çalışmada hazır MS besi ortamı kullanılmıştır. MS besi ortamına ait bileşen içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir. MS besi ortamının hazırlanmasında çözücü olarak etüvde 2 saat boyunca 180 °C'de sterilize edilen distile su kullanılmıştır. 1 lt MS besi ortamı hazırlamak için 4.4 g hazır MS 1 lt hacmindeki behere doldurulan 1 lt steril distile suda çözdürülmüş ardından 30 g/l sakkaroz eklenip çözdürülmüş ve en son ise 7 g/l agar eklenip çözdürülmüştür. pH derecesi de 5.8'e ayarlandıktan sonra çalışmanın amacına göre istenilen BBD konsanstrasyonları eklenip otoklavda (121 °C, 1.5 atm) 20 d süreyle sterilizasyona tabii tutulmuştur. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra kültür odasında steril hava akışlı kabinde soğutulmaya bırakılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. MS besi ortamının hazırlanması (A), pH kontrolü (B), hazırlanmış MS (C)

Çizelge 3.1. Hazır MS (M5519) besi ortamı içeriği

Bileşenler	**mg/l**
NH_4NO_3	1650
H_3BO_3	6.2
$CaCI_2.2H_2O$	332.2
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.26
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$MnSO_4.H_2O$	180.7
$MnSO_4.4H_2O$	16.9
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
KI	0.83
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
Glisin	2
Myo-inositol	100
Nikotinik asit	0.5
Pirodoksin-HCL	0.5
Thiamine-HCL	0.1

3.2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

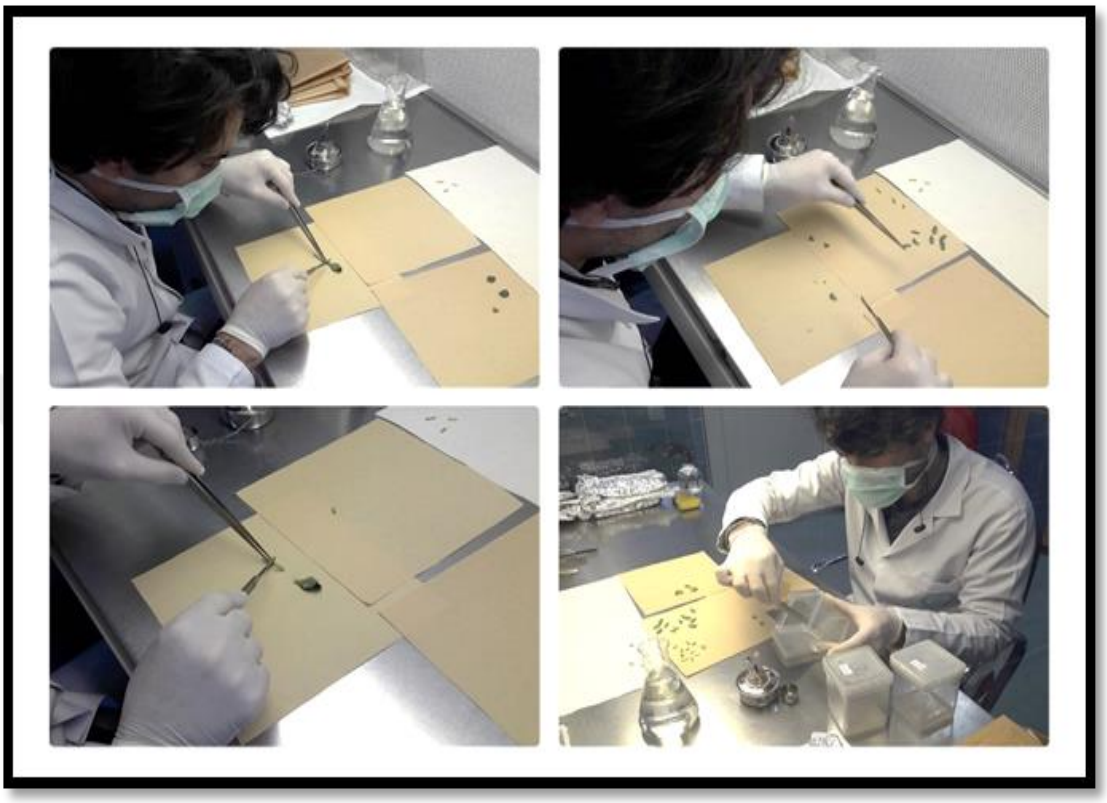
Çalışmada kullanılan bütün BBD stok çözeltileri 1 mg/l konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Hassas terazide 100 mg olarak ölçülen BBD balonjojeye birkaç ml çözücü eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldükten sonra steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler renkli şişelerde buzdolabında 4 °C'de tutulmuştur. Stok çözeltiler belli sürelerde yeniden hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan BBD ve Çözücüleri

BBD		**Çözücü**
2,4-D	(2,4-D Diklorofenoksi asetik asit)	EtOH/NaOH
IAA	(İndol-3-asetik asit)	EtOH/NaOH
NAA	(α-Naftalen asetik asit)	EtOH/NaOH
BAP	(6-Benzilaminopurin)	NaOH
TDZ	(Thidiazuron)	KOH
Kin	(Thidiazuron)	NaOH

3.2.5. Kallus ve Somatik Embriyogenesis Başlatma Çalışmaları

Tez çalışmasında iki farklı deney gerçekleştirilmiştir. Deneylere ait detaylar aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.



Şekil 3.2. Eksplant kesimi ve kallus oluşumu için kültür başlatma işlemleri

3.2.5.1. Deney I

Deney I'de eksplant kaynağı olarak yaklaşık 25 mm^2 ebatındaki 20 günlük kotiledon kesitleri kullanılmıştır. Her petri veya Magenta GA-7 kültür kabında 8 adet 25 mm^2 boyutunda kesilmiş kotiledon kısımlarının üst yüzeyleri NAA (0.5, 1 ve 1.5 mg/l), 2,4-D (0.5, 0.75, 1 mg/l) ve TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l) konsantrasyon ve kombinasyonlarını (Çizelge 3.3) ve 30 mg/l sakkaroz (Merck) ve 7 g/l agar (Sigma) içeren ve BBD içermeyen kontrol grubu da dahil olan MS besi ortamına temas edecek şekilde yerleştirilmiş (Şekil 3.6) ve ardından kültürler 25±2 °C'de tam karanlıkta 1 hafta inkübasyona alınmıştır. Kültürler daha sonra 16 s aydınlık ve 8 s karanlık fotoperiyotuna alınmıştır. Kallus oluşumuna yanıt veren kültürler 3-4 haftada altkültüre alınarak embriyogenik kallus elde edilmesi amaçlanarak kültür işlemleri devam ettirilmiştir. Embriyogenik kallusa dönüşen kültürler 1.altkültürden sonra embriyo oluşumunun teşvik

edilmesi için içerisinde oksin bulunmayan 2 farklı sitokinin tipi olan BAP (1 mg/l) ve TDZ (0.1 mg/l) içeren MS ortamına transfer edilmiş ve her bir kültür kabına 4 eksplant düşecek şekilde paylaşılıp aktarılmıştır. Böylece farklı sitokinin tiplerinin embriyo oluşumuna etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Kültürler 12 haftaya kadar takip edilebilmiş ve 12 haftanın sonunda yaş kallus çapları ve ağırlıkları ölçümleri yapılmak üzere kültür işlemleri durdurulmuş ve gerekli ölçümler dijital kumpas ve dijital hassas terazi (XT 320m, Precisa) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.7).

Çizelge 3.3. Deney I'de kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonları (mg/l)

No	TDZ	NAA	No	TDZ	2,4-D
1	0.0	0.0	17	0.0	0.0
2	0.1	0.0	18	0.1	0.0
3	0.25	0.0	19	0.25	0.0
4	0.5	0.0	20	0.5	0.0
5	0.0	0.5	21	0.0	0.5
6	0.1	0.5	22	0.1	0.5
7	0.25	0.5	23	0.25	0.5
8	0.5	0.5	24	0.5	0.5
9	0.0	1.0	25	0.0	0.75
10	0.1	1.0	26	0.1	0.75
11	0.25	1.0	27	0.25	0.75
12	0.5	1.0	28	0.5	0.75
13	0.0	1.5	29	0.0	1.0
14	0.1	1.5	30	0.1	1.0
15	0.25	1.5	31	0.25	1.0
16	0.5	1.5	32	0.5	1.0



Şekil 3.3. Deney I'de yaş kallus ağırlık ve çap ölçüm işlemlerinin yapılması

3.2.5.2. Deney II

Deney II'de 5 günlük kotiledon, kotiledon çeneği ve hipokotil eksplant olarak kullanılmıştır (şekil 3.3). Deneyde kullanılan Magenta GA-7 kültür kapların ve cam petrilerin (100x20 / 120x20 mm) her birinde en az 5 adet eksplant olacak şekilde Deney I'de anlatıldığı gibi kültüre alınmıştır. Bu deneyde BBD'nin somatik embriyogenesisin üzerindeki etkileri araştırılmak üzere farklı oksin ve sitokinin tipleriyle; BAP – NAA, BAP – 2,4-D, TDZ – NAA ve TDZ – 2,4-D olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Eksplantlar, içerisinde sitokinin ve oksin tipleri olan BBD kombinasyonları, 30 g/l sakkaroz (Merck) ve 7 g/l agar (Sigma) da içeren 64 (kontrol grupları dahil) farklı MS besi ortamında 25±2 °C'de tam karanlıkta 1 hafta süresince inkübasyona alınmıştır. Bu konsantrasyon ve kombinasyonlar aşağıda Çizelge 3.4'te verilmiştir. Kültürler daha sonra 16 s aydınlık ve 8 s karanlık fotoperiyoduna alınmıştır. Kallus oluşumuna yanıt verenler 3-4 haftada 1 aynı ortamda alt kültüre alınmıştır. Embriyogenik gözlemler, embriyo sayımları ve görseller, binoküler mikroskoplar (Zeiss Stemi-Dv4/ Zeiss stemi 2000-C) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Kallus oluşum oranı 3 ila 4. haftada, embriyogenik kallus oluşum oranı ve somatik embriyo sayıları 5. haftadan itibaren kaydedilmeye başlanmıştır. Embriyogenik kallus oluşturan kültürlerde meydana gelen preglobular, globular, kalp şeklinde ve kotiledon safhası ve sürgün oluşturup bitkiciklere dönüşen somatik embriyolar, embriyo olgunlaştırma ve çimlendirme ortamlarına (hormonsuz MS besi ortamı, 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamı ve 1 mg/l Kin içeren MS besi ortamı) aktarılmıştır. Somatik embriyoların olgunlaşıp çimlenerek kök ve sürgün oluşturup bitkiciğe dönüşmelerinin ardından MS ortamından çıkarılıp çeşme suyunda yıkanmış ve steril torf içeren kültür kaplarında (Magenta GA-7) veya cam kavanozlarda (çap: 7 cm, yük.: 13.5 cm) aynı şartlarda aklimatize edilmek üzere kontrollü büyüme odasında tutulmuştur. İlk hafta yüksek nem oranını korumak için 1 hafta boyunca kültür kapları veya cam kavanozların kapakları kapalı tutulmuş ardından kültür kapları veya cam kavanozların kapakları açılmıştır. Sonraki hafta nem oranını istenilen düzeyde tutmak için kültür kaplarının veya cam kavanozların ağızları hafif şekilde açık bırakılmış veya 1 mm çapında alt tarafından delik açılmış pet bardaklar cam kavanozların ağzına geçirilerek kapatılmıştır. 2-3 gün arayla kültür kapları belirli sürelerde ağzı açık tutulmuş veya pet bardaktaki delik sayısı artırılmıştır. 3. Haftada kültürler kaplarından çıkarılarak steril torf içeren saksılara (çap: 8.5 cm, yük.: 8.5 cm) aktarılmış ve saksıların üstü cam beherle

kapatılmış ve sera şartlarına sahip alıştırma odasına transfer edilmiştir. Bir hafta boyunca 2-3 gün arayla üzerlerine konulan cam beherler kaldırılarak sulanmış ve 1-2 saat süresince havalandırılmıştır. Sonraki haftada gelişip arazi şartlarına aktarılabilirliği olan bitkicikler arazi şartlarına transfer edilmiştir. Bitkiciklerin haftalık sürgün boyu uzunlukları dijital kumpas veya cetvel ile ölçülüp kaydedilmiştir.

Çizelge 3.4. Deney II'de kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonları (mg/l)

No	BAP	NAA	No	BAP	2,4-D	No	TDZ	NAA	No	TDZ	2,4-D
1	0.0	0.0	17	0.0	0.0	33	0.0	0.0	49	0.0	0.0
2	0.0	0.05	18	0.0	0.1	34	0.1	0.0	50	0.1	0.0
3	0.0	0.1	19	0.0	0.5	35	0.25	0.0	51	0.25	0.0
4	0.0	0.5	20	0.0	1.0	36	0.5	0.0	52	0.5	0.0
5	1.0	0.0	21	1.0	0.0	37	0.0	0.5	53	0.0	0.5
6	1.0	0.05	22	1.0	0.1	38	0.1	0.5	54	0.1	0.5
7	1.0	0.1	23	1.0	0.5	39	0.25	0.5	55	0.25	0.5
8	1.0	0.5	24	1.0	1.0	40	0.5	0.5	56	0.5	0.5
9	2.0	0.0	25	2.0	0.0	41	0.0	1.0	57	0.0	0.75
10	2.0	0.05	26	2.0	0.1	42	0.1	1.0	58	0.1	0.75
11	2.0	0.1	27	2.0	0.5	43	0.25	1.0	59	0.25	0.75
12	2.0	0.5	28	2.0	1.0	44	0.5	1.0	60	0.5	0.75
13	3.0	0.0	29	3.0	0.0	45	0.0	1.5	61	0.0	1.0
14	3.0	0.05	30	3.0	0.1	46	0.1	1.5	62	0.1	1.0
15	3.0	0.1	31	3.0	0.5	47	0.25	1.5	63	0.25	1.0
16	3.0	0.5	32	3.0	1.0	48	0.5	1.5	64	0.5	1.0

3.2.6. Embriyo Olgunlaştırma ve Çimlendirme

Kültür başlatma sonucu kalluslardan meydana gelen, globular, torpido, kalp şekli ve kotiledon safhasındaki somatik embriyolar, Kin (1 mg/l), IAA (1 mg/l) ve BBD içermeyen (kontrol) 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar bulunan MS besi ortamında, 25±2 °C'de 16 s aydınlık ve 8 s karanlık fotoperiyota sahip büyüme odasında kültüre alınmıştır. Kültürler 3 ila 4 hafta arayla altkültüre alınmıştır. Köklenip primer kök ve yaprak oluşturan embriyolar bu ortamdan alınıp çeşme suyu altında agarlı ortamdan temizlenmiş ve aklimatizasyon işlemine tabii tutulmuştur.

3.2.7. Aklimatizasyon İşlemleri

Çimlenen embriyolar, otoklavda (121 °C, 1.5 atm'de 20 dk.) steril edilmiş torf içeren Magenta GA-7 kültür kabına aktarılmış ve aklimatizasyon işlemi için aynı kültür şartlarında bekletilmiştir. Magenta kaplarının kapakları ilk haftadan sonra aşamalı olarak açılmıştır. Bitkicikler 3-4 haftadan sonra steril torf içeren 8.5 x 8.5 (cm) saksılara

aktarılarak üzerleri 1 haftalığına beherler ile kapatılarak aklimatizasyon odasına (sera şartları) alınmıştır. 2-3 gün arayla bitkiciklerin üzerleri 1-2 saat açık bırakılmıştır. Daha sonra beherler tamamen kaldırılmış ve 4. haftadan sonra aklimatize olup hayatta kalan bitkicikler arazi şartlarına transfer edilmiştir.

3.2.8. Çalışmada Yapılan Ölçüm ve Gözlemler

İn vitro olarak elde edilen 5 ve 20 günlük eksplantlar kullanılarak somatik embriyogenesis için 2 farklı kültür başlatılmış, yapılan deney ve gözlemler Deney I ve Deney II başlıkları ile aşağıda verilmiştir.

3.2.8.1. Deney I

- **Eksplantlarda kallus oluşum oranı (%):** Her bir kültür kabı veya petride, kallus oluşumu meydana gelen eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Eksplantlarda embriyogenik kallus oluşum oranı (%):** Her bir kültür kabı veya petride, embriyogenik kallus meydana getiren eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Eksplantların yaş kallus ağırlığı (mg):** Kallusa dönüşen eksplantların hassas terazide tartılmış mg cinsinden ağırlıklarını ifade eder.
- **Yaş kallusların çap uzunlukları (mm):** Yaş kallus çapları, dijital kumpas ile ölçülmüş mm cinsinden uzunluklarını ifade eder.

- **NAA'nın sitokinin tipi TDZ ile birlikte kullanımının somatik embriyogenesiste kallus oluşumuna etkisi**

  NAA'nın 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l konsantrasyonlarının her biri TDZ' nun (0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) ile kombinasyonlarının somatik embriyogenesiste kallus oluşturma etkileri araştırılmıştır.

- **2,4-D'nin sitokinin tipi TDZ ile birlikte kullanımının somatik embriyogenesiste kallus oluşumuna etkisi**

2,4-D'nin ve 0.5, 0.75 ve 1 mg/l konsantrasyonlarının her biri TDZ ile (0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarının somatik embriyogenesiste kallus oluşturma etkileri araştırılmıştır.

- **TDZ ile birlikte kullanılan NAA'nın somatik embriyogenesiste embriyogenik kallus ve embriyo oluşumuna etkisi**

TDZ'nin 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l konsantrasyonları ile NAA'nın 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l konsantrasyonları ile kombinasyonlarının embriyogenik kallus oluşturma üzerine etkileri araştırılmıştır.

- **TDZ ile birlikte kullanılan 2,4-D'nin somatik embriyogenesiste embriyogenik kallus ve embriyo oluşumuna etkisi**

2,4-D'nin 0.5, 0.75, 1.0 mg/l konsantrasyonları ile TDZ'nin 0.1, 0.25, 0.5 mg/l konsantrasyon kombinasyonlarının somatik embriyogenesiste embriyogenik kallus oluşturma etkileri araştırılmıştır.

- **Sitokinin tiplerinin embriyogenik kallus ve embriyo oluşumuna etkisi**

Embriyogenik kallus indüksiyonu için kalluslar TDZ (0.1 mg/l) veya BAP (1 mg/l) içeren MS ortamlarında kültüre alınarak embriyogenik kallus oluşturma etkileri araştırılmıştır.

- **BBD'nin yaş kallus ağırlık ve çap uzunlukları üzerinde etkisi**

TDZ, NAA, 2,4-D ve BAP'ın çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılarak yaş kallus ağırlığı ve çap uzunlukları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3.2.10.2. Deney II

- **Eksplantlarda kallus oluşum oranı (%):** Her bir kültür kabı veya petride, kallus meydana getiren eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Eksplant tiplerinde kallus oluşum oranı (%):** Her bir eksplant tipi için; kallus oluşturan eksplant sayısının toplam eksplant tipinin sayısına oranının 100 ile çarpımının ifadesidir.

- **Eksplantlarda embriyogenik kallus oluşum oranı (%):** Her bir kültür kabı veya petride, embriyogenik kallus oluşturan eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Eksplant başına somatik embriyo sayısı (adet/kallus):** Kültüre alınan her bir eksplantta meydana gelen embriyo sayısıdır.
- **Eksplant tipi başına somatik embriyo sayısı (adet/kallus):** Eksplant tipleri olan Kotiledon, hipokotil ve kotiledon çeneğinin oluşturduğu embriyo sayısıdır.
- **Somatik embriyo safhalarının gözlenmesi:** Somatik embriyoların globular, kalp şekli, torpido ve kotiledon safhalarının tespit edilmesi.
- **Çimlenen somatik embriyo sayısı (adet):** Kültüre alınan eksplantlardan elde edilen somatik embriyoların, çimlenme ortamında kültüre alınmasıyla çimlenen embriyoların sayısıdır.
- **Çimlenen somatik embriyo oranı (%):** Kültüre alınan eksplantlardan elde edilen somatik embriyoların, çimlenme ortamında kültüre alınmasıyla çimlenen embriyo sayısının toplam embriyo sayısına oranının 100 ile çarpmını ifade eder.
- **Bitkiciklere dönüşen somatik embriyo sayısı (adet):** Somatik embriyoların çimlenme ortamında kültüre alınması sonucu çimlenen embriyolardan bitkiciklere dönüşenlerin sayısını ifade eder.
- **Bitkiciklere (embling) dönüşen somatik embriyoların oranı (%):** Bitkiciklere dönüşen embriyo sayısının tüm somatik embriyo sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Çimlenen somatik embriyoların bitkiciklere (embling) dönüşme oranı (%):** Bitkiciklere dönüşen somatik embriyo sayısının çimlenen somatik embriyo sayısına oranının 100 ile çarpımını ifade eder.
- **Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) kök uzunluğu (cm):** 3 ila 4 hafta içerisinde kök ve sürgün oluşturan embriyoların dönüştüğü bitkicikler aklimatizasyona alınmadan önce dijital kumpas veya cetvel yardımıyla ölçülen kök uzunluklarının cm cinsinden değerini ifade eder.

- **Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) sürgün boyu (cm):** 3 ila 4 hafta içerisinde kök ve sürgün oluşturan embriyoların dönüştüğü bitkiciklerin aklimatizasyona alınmadan önce dijital kumpas veya cetvel yardımıyla ölçülen sürgün boylarının cm cinsinden değerini ifade eder.
- **Aklimatizasyona alınan bitkicik sayısı (adet):** Somatik embriyoların olgunlaşıp çimlenmesiyle kök ve sürgün oluşturup bitkiciklere dönüşenlerin sayısını ifade eder.
- **NAA'nın farklı sitokinin tipleri ile birlikte kullanımının somatik embriyogenesiste kallus oluşumuna etkisi**

  NAA'nın 0.05, 0.1, 0.5 mg/l konsantrasyonları ile BAP'ın 1, 2, 3 mg/l ve TDZ'nin 0.1, 0.25, 0.5 mg/l konsantrasyonları ile kombinasyonlar oluşturulup birlikte kullanılarak somatik embriyogenesiste kallus oluşturma üzerine etkileri araştırılmıştır.

- **2,4-D'nin farklı sitokinin tipleri ile birlikte kullanımının somatik embriyogenesiste kallus oluşumuna etkisi**

  2,4-D'nin 0.1, 0.5, 1 mg/l konsantrasyonları ile BAP'ın 1, 2, 3 mg/l ve TDZ'nin 0.1, 0.25, 0.5 mg/l konsanstrasyonları ile kombinasyonlar oluşturulup birlikte kullanılarak somatik embriyogenesiste kallus oluşturma üzerine etkileri araştırılmıştır.

- **NAA ve 2,4-D'nin farklı sitokinin tipleri ile birlikte kullanımının somatik embriyogenesiste embriyogenik kallus ve embriyo oluşumuna etkisi**

  NAA'nın 0.05, 0.1, 0.5 mg/l ve 2,4-D'nin 0.1, 0.5, 1 mg/l konsantrasyonları ile BAP'ın 1, 2, 3 mg/l ve TDZ'nin 0.1, 0.25, 0.5 mg/l konsantrasyonları ile kombinasyonlar oluşturulup birlikte kullanılarak oksinlerin somatik embriyogenesiste embriyogenik kallus ve embriyo oluşturma üzerine etkileri araştırılmıştır.

- **BAP'ın NAA ve 2,4-D ile kombinasyonlarının somatik embriyo sayısı üzerine etkisi:**

  BAP'ın 1, 2, 3 mg/l konsantrasyonları ile NAA (0.05, 0.1, 0.5 mg/l) ve 2,4-D'nin (0.1, 0.5, 1 mg/l) konsantrasyonları ile oluşturulan kombinasyonların somatik embriyo sayısı üzerine etkileri araştırılmıştır.

- **IAA ve Kinetin'in somatik embriyoların olgunlaşma, çimlenme ve sürgün oluşumuna etkisi**

  Eksplantlardan rejenere edilen somatik embriyolar IAA, Kinetin ve kontrol (BBDsiz) ortamlarda kültüre alınarak oksin ve sitokininlerin olgunlaştırma, çimlendirme ve sürgün oluşturma etkileri araştırılmıştır.

- **IAA ve Kinetin'in somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) sürgün boyu uzunluğuna etkisi**

  Somatik embriyolar, IAA (1 mg/l), Kinetin (1 mg/l) ve kontrol (BBDsiz) grubu olmak üzere üç farklı olgunlaştırma, çimlendirme ortamlarında geliştirilmeye bırakılmıştır. IAA ve Kinetin'in bitkiciklerin sürgün boyu uzunluğuna etkisini araştırmak üzere; Somatik embriyolardan kök ve sürgün oluşturan bitkiciklerin sürgün boyu uzunlukları kültüre alındıktan 3 ila 4 hafta sonra aklimatizasyona alma sırasında dijital kumpas veya cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

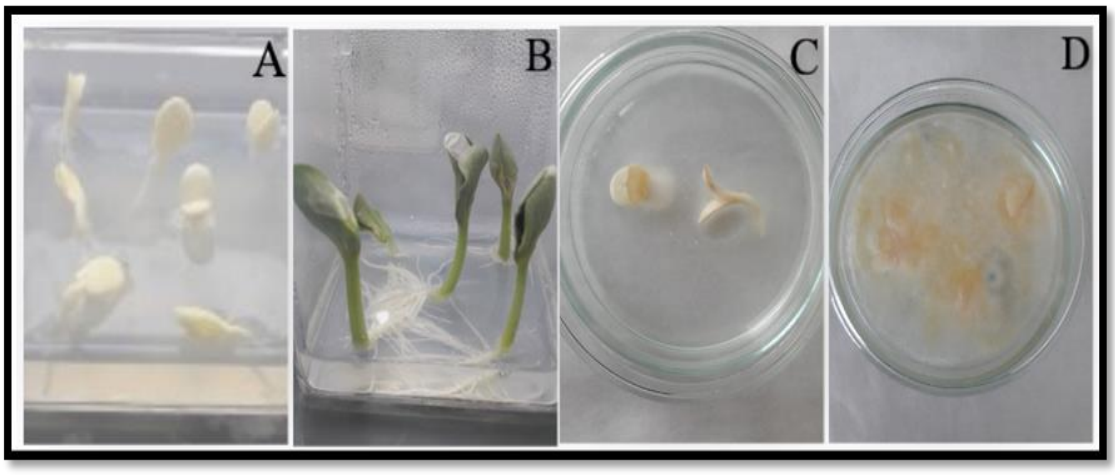
3.2.10. Verilerin Analizi

Tez çalışmasında gerçekleştirilen deneyler Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuştur. Çalışmada elde edilen veriler istatistik analizinden önce oran ve yüzde (%) verilerine Microsoft Excel programında Açı transformasyonu ve Karekök dönüşümleri yapılmıştır. Sayı değerleri için karekök dönüşümleri yapılmadan önce genellikle çok sayıda sıfırlardan oluşan, 10'dan küçük değerlere +1 ($\sqrt{X+1}$) eklenerek Karekök transformasyonu uygulanmıştır. Çok sıfır içeren veri setlerinde Karekök transformasyonun uygulandığını Compton ve Gray (1993) rapor etmiştir. İstatistiksel analizler, SAS istatistik programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Tohumların Sterilizasyonu

Sterilizasyon yöntemi olarak, Chee (1991), Pirinç (2004), Zhang ve ark. (2014) ve Vinoth ve Ravindhran (2016)'nin sterilizasyon için kullandığı yöntemlerden yararlanarak optimize edilmiştir. Bir yıllık olgun Sürme tipi karpuz tohumları herhangi bir sterilizasyona tabii tutulmadan MS ortamında çimlendirilmeye bırakıldığında 1. günden itibaren %100 enfeksiyon (mantari) gözlenmiştir (Şekil 4.1 C-D). Bu çalışmada aşağıdaki sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır: Sürme tipi olgun karpuz tohumlarının kabukları manuel olarak çıkarılmış kabuksuz tohumlar 3-5 d boyunca çeşme suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra tohumlar %70'lik etanol içerisinde 60 s boyunca çalkalanmıştır ve ardından 3 kez steril distile su ile çalkalanmıştır. Tohumlar bu defa ise %5 NaOCl + 1-2 ml Tween-20 eklenen çözeltisinde 5 d boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra tohumlar steril distile su ile 5 d çalkalanmıştır, bu işlem 5 kez tekrar edilmiştir. Tohumlar kurutulmak üzere steril hava akışlı kabin içerisinde steril kağıtlar üzerinde kurutulmaya bırakılmıştır. Farklı sterilizasyon yöntemleri denenmiştir ancak en iyi sonuç, %0 kontaminasyon ve MS besi ortamında yaklaşık %99 oranında çimlenme başarısı bu yöntemden sağlanmıştır (Şekil 4.1 A-B) ve çalışma boyunca olgun tohumların sterilizasyonu için bu sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır.

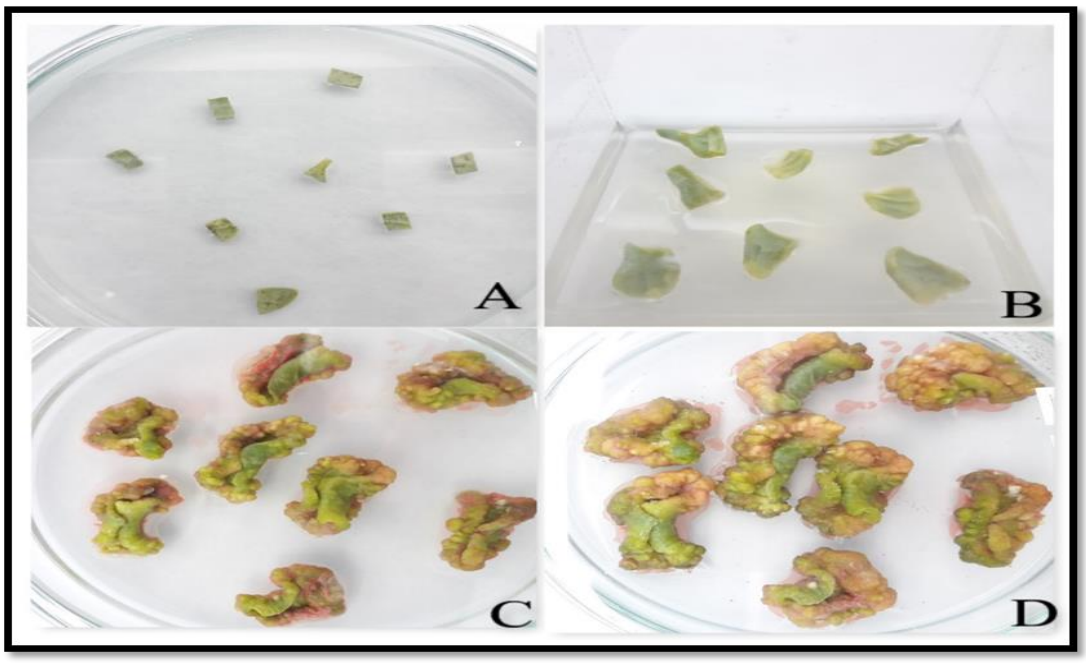


Şekil 4.1. Modifiye sterilizasyon protokolü uygulanmış tohumlar (A:3. gün, B: 7. gün) ve uygulanmamış olan tohumların çimlenmesinde enfeksiyon tespiti (C ve D 3.gün)

4.2. Deney I'de Yapılan Embriyogenesis Çalışmaları

4.2.1. Kallus ve Embriyogenik Kallus Oluşumu

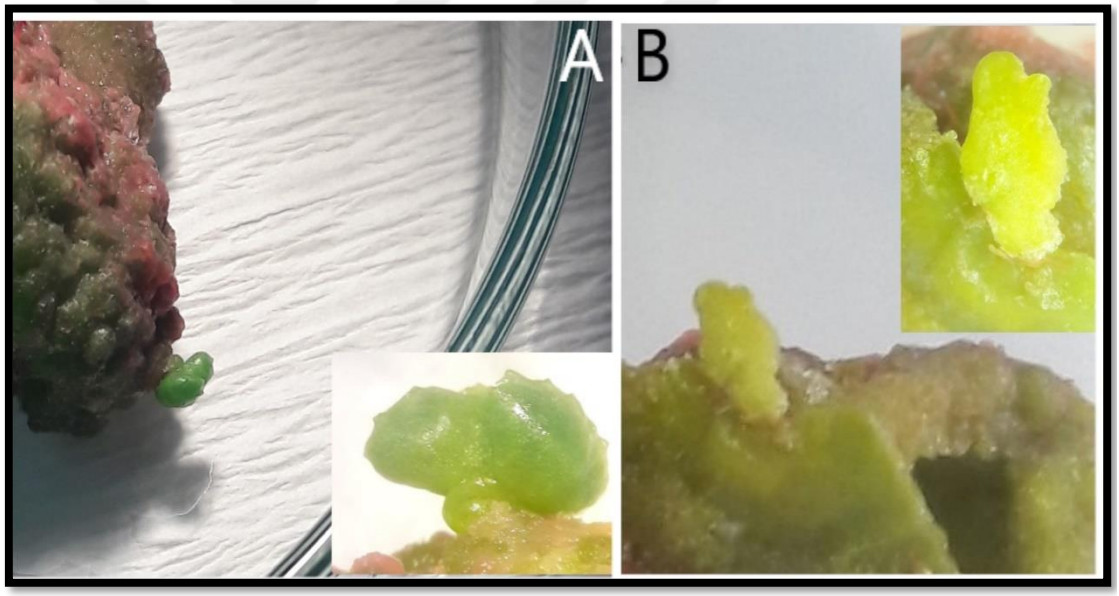
Bu deneyde kültürler ilk haftadan sonra hacimsel olarak büyümeye başlamıştır. 3 haftadan sonra ilk kallus oluşumu bazı eksplantlarda çok hafif ve seyrek olmakla birlikte 2.haftada başlamış ve 4 hafta aradan sonra eksplantlarda hacimsel olarak her bir ortamda farklı olmakla birlikte 1-8 kat arasında değişen bir büyüme ve yoğun kallus oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.2). TDZ – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında kallus oluşumu meydana gelirken, TDZ – 2,4-D kombinasyonlarında ise kallus oluşumu meydana gelmemiş ve eksplantlar 7 hafta aradan sonra kahverengileşip zamanla kurumuşlardır. Kallus oluşum oranları Çizelge 4.1'de görüleceği gibi tüm TDZ – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında %100 gibi bir hayli yüksek oranda meydana gelmiştir. Kallus oluşumu gözlemlenen tüm kültürler embriyogenik kallus oluşumunun teşvik edilmesi amacıyla bir kez daha aynı ortamlarda altkültüre 3-4 hafta aradan sonra alınmış ve altkültür sonucunda tüm eksplantlarda hacimsel anlamda artış ve proembriyogenik benzeri nodüler yığınlar meydana gelerek embriyogenik hale geldiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Deney I'deki kültürlerin gelişim aşamaları; **A:** İlk kültüre alınan eksplantlar (0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l TDZ), **B:** 1 hafta aradan sonraki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ), **C:** 4. haftadan sonra ilk altkültürdeki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ), **D:** 9.haftadaki gelişimleri (0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ)

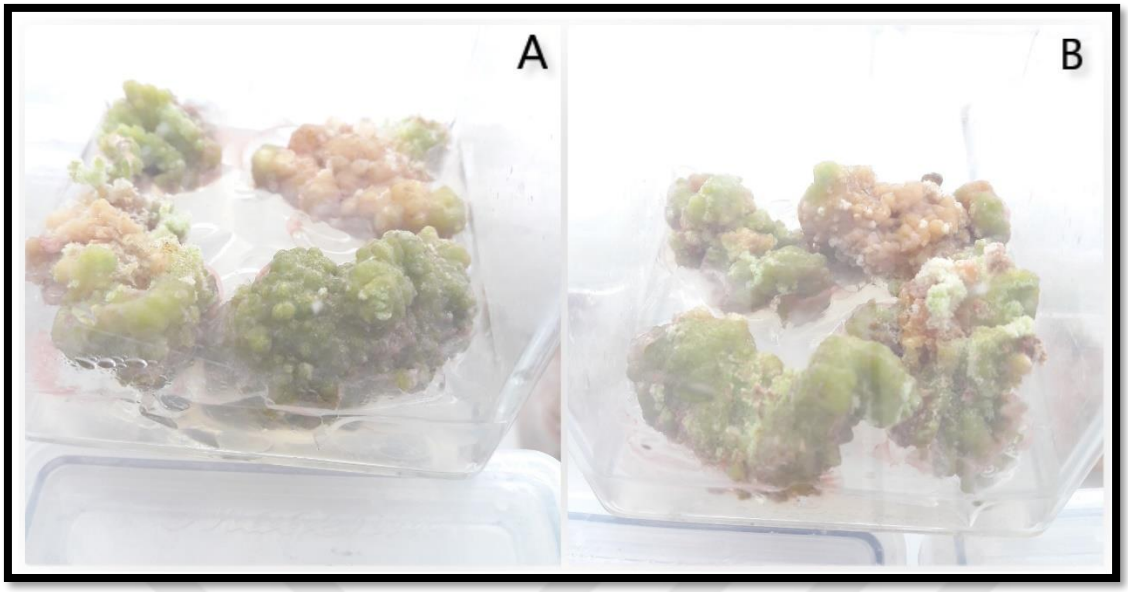
Altkültür sonucu kültürler embriyo indüksiyonu ve embriyo olgunlaştırma amacıyla oksin içermeyen sadece sitokinin tipleri olan TDZ (0.1 mg/l) veya BAP (1 mg/l) bulunan MS besi ortamında kültürü sürdürülmüş ancak embriyogenik kalluslardan sadece yumru şeklinde kaynaşmış embriyogenik doku tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

Ayrıca, TDZ içeren ortamların genelinde ve diğer uygulamaların bazılarında Şekil 4.3'te de görüleceği gibi kırmızı bazen de sarı renkte bir kontaminasyon söz konusu olmuştur. Kontaminasyon genellikle ilk önce eksplantın dibinde belirerek daha sonra eksplant yüzeyini kaplamaktadır. Büyük kallus yığını oluşturan veya embriyogenik kalluslarda etkisi az görülmekte ancak henüz kallus oluşturmayan veya çok hafif bir şekilde yüzeysel kallus oluşturan eksplantlarda ilerleyen haftalarda kararmalar gözlenmiştir. Bunun fenolik bileşik salgısından, endojen veya ekzojen kaynaklı bir kontaminasyon sonucu meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.3. Deney I'de oluşan embriyogenik yapılar; **A:** 12.hafta (1.altkültüre kadar 0.25 mg/l TDZ, 2.altkültürde TDZ 0.1 mg/l), **B:** 1.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l TDZ (5.hafta sonunda)

İlk kültüre alımından itibaren, 12 hafta aradan sonra herhangi bir somatik embriyo tespit edilememesi sonucu her bir kallusun ağırlığı ve çap ölçümü yapılıp kaydedilerek kültür işlemi sonlandırılmıştır.



Şekil 4.4. Deney I'de kültürlerin 2.altkültürdeki gelişimleri (12.hafta); A: Başlangıç ve 1.altkültür 0.5 mg/l TDZ, 2.altkültür: 1 mg/l BAP, B: Başlangıç ve 1.altkültür 0.1 mg/l TDZ, 2.altkültür: 1 mg/l BAP

Vinoth ve Ravindhran (2016), karpuzda (*Citrullus lanatus* cv. Arka Manik) somatik embriyogenesis ile rejenerasyon çalışmalarında 20-günlük kotiledon eksplantları ve çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonları kullanmışlardır. Çalışmalarında 2.44 µM (0.5 mg/l) 2,4-D + 2.27 (0.5 mg/l) TDZ içeren MS ortamından %96.8 gibi yüksek bir oranda embriyogenik kallus oluşumunun gerçekleştiğini ve aynı ortamdan yaklaşık 16 adet somatik embriyo ile en yüksek embriyo sayısını elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda aynı ortamdan embriyogenik kallus elde edilmiş ancak somatik embriyo oluşumu gerçekleşememiş ve bundan genotip ektisinin olduğu düşünülmektedir. Genetik faktörlerin SE kabiliyeti üzerinde büyük bir rol oynadığı, Jelaska (1974); Malepszy ve Nadolska-Orczyk (1983); Callebaut ve ark. (1987); Colijn-Hooymans ve ark. (1988a, b); Gray ve ark. (1993); Oridate ve ark. (1992) tarafından bildirilmiştir (Debeaujon ve Branchard, 1993). Vengadesan ve ark. (2005) da eksplant kaynağı olarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen 20 günlük hıyar (*Cucumis sativus L.*) fidelerinin yapraklarını kullanmış ve bu eksplantlardan parlak yeşil renkte dağılgan bir yapıda olan embriyogenik kallus elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.1. Deney I'de TDZ –NAA - 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının ortalama kallus ve embriyogenik kallus oluşum oranına etkisi

	BBD (mg/l)			Kallus oluşum oranı		Emb. kallus oranı
No	**TDZ**	**NAA**	**2,4-D**	**Açı Trans.**	**(%)**	**(%)**
1	0.1	0.5	0.0	90	100 a	100
2	0.25	0.5	0.0	90	100 a	100
3	0.5	0.5	0.0	90	100 a	100
4	0.1	1.0	0.0	90	100 a	100
5	0.25	1.0	0.0	90	100 a	100
6	0.5	1.0	0.0	90	100 a	100
7	0.1	1.5	0.0	90	100 a	100
8	0.25	1.5	0.0	90	100 a	100
9	0.5	1.5	0.0	90	100 a	100
10	0.0	0.5	0.0	90	100 a	43.8
11	0.0	1.0	0.0	90	100 a	37.5
12	0.0	1.5	0.0	90	100 a	25.0
13	0.1	0.0	0.0	90	100 a	100
14	0.25	0.0	0.0	90	100 a	100
15	0.5	0.0	0.0	90	100 a	100
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b	0.0
17	0.1	0.0	0.5	0.0	0.0 b	0.0
18	0.25	0.0	0.5	0.0	0.0 b	0.0
19	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0 b	0.0
20	0.1	0.0	0.75	0.0	0.0 b	0.0
21	0.25	0.0	0.75	0.0	0.0 b	0.0
22	0.5	0.0	0.75	0.0	0.0 b	0.0
23	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0 b	0.0
24	0.25	0.0	1.0	0.0	0.0 b	0.0
25	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0 b	0.0
26	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0 b	0.0
27	0.0	0.0	0.75	0.0	0.0 b	0.0
28	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0 b	0.0
29	0.1	0.0	0.0	90	100 a	100
30	0.25	0.0	0.0	90	100 a	100
31	0.5	0.0	0.0	90	100 a	100
32	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b	0.0
LSD 0.05					**0**	**-**

* Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir. Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

4.2.2. Yaş Kallus Ağırlığı ve Kallus Çap Ölçümleri

Bu deneyde 20-günlük kotiledon eksplantları kullanılarak BBD'lerin yaş kallus ağırlığı ve çap genişliğine etkisini belirlemek için yapılmış ve 12 haftalık kültür sonucunda rapor edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. BBD'lerin hem yaş kallus ağırlığı (Çizelge 4.2) hem de yaş kallusların çap genişliği üzerine etkisi varyans analiz sonucuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Deney I'de kotiledon eksplantlarında oluşan yaş kallus ağırlığına ait varyans analizi

Kaynak	**SD**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F değeri**
BBD	29	46815769.87	1614336.89	173.39*
Hata	30	279318.09	9310.60	
Genel Toplam	**59**	**47095087.96**		
VK (%)	**4.005517**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

Çizelge 4.3. Deney I'de kotiledon eksplantlarında oluşan yaş kallusların çap uzunluğuna ait varyans analizi

Kaynak	**SD**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F değeri**
BBD	29	1253.790217	43.234145	566.19*
Hata	30	2.290797	0.076360	
Genel Toplam	**59**	**1256.081014**		
VK (%)	**1.055449**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

Kültürlerde oldukça yüksek miktarlarda kallus oluşumu meydana gelmiştir. En yüksek yaş kallus ağırlık ortalaması 4184.25 mg ile 4 nolu (başlangıçta ve 1.altkültürde 0.25 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA ardından 2.altkültürde 1 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınmıştır.) ortamda meydana gelirken, en düşük yaş kallus ağırlığı ise 820.1 mg ile 7 nolu (başlangıçta ve 1.altkültürde 0.1 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA ve ardından 2.altkültürde ise 0.1 mg/l TDZ içeren ortamda kültüre alınmıştır.) ortamda meydana gelmiştir. En büyük çap genişliği 35.14 mm ile 6 nolu ortamda meydana gelirken, en küçük çap genişliği ise 16.27 cm ile 16 nolu ortamda meydana gelmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Deney I'de meydana gelen yaş kallusların ağırlık ve çap değerleri

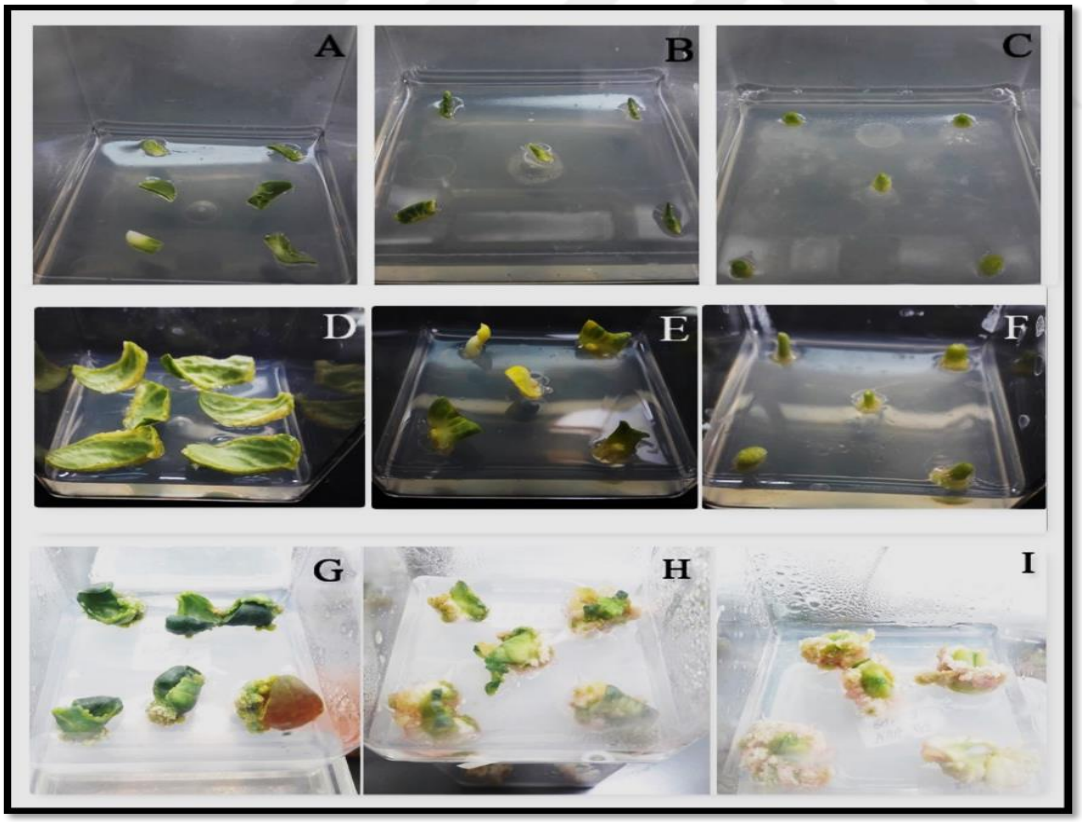
	BBD (mg/l)						Ort. Yaş kallus	
	Başlangıç		1. Altkültür		2. Altkültür		Ağırlığı	Çapı
No	TDZ	NAA	TDZ	NAA	TDZ	BAP	(mg)	(mm)
1	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.0	2052.75 h	24.18 mn
2	0.1	0.5	0.1	0.5	0.0	1.0	1592.88 ij	27.15 h
3	0.25	0.5	0.25	0.5	0.1	0.0	3648.50 b	28.98 e
4	0.25	0.5	0.25	0.5	0.0	1.0	4184.25 a	34.87 a
5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.0	3141.38 c	29.90 d
6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	1.0	4112.13 a	35.14 a
7	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	0.0	820.10 l	18.46 s
8	0.1	1.0	0.1	1.0	0.0	1.0	1431.25 j	21.93 p
9	0.25	1.0	0.25	1.0	0.1	0.0	3286.50 c	26.40 i
10	0.25	1.0	0.25	1.0	0.0	1.0	2823.0 d	25.75 j
11	0.5	1.0	0.5	1.0	0.1	0.0	2478.75 e	28.01 gf
12	0.5	1.0	0.5	1.0	0.0	1.0	2936.75 d	25.74 j
13	0.1	1.5	0.1	1.5	0.1	0.0	2227.25 gh	28.33 f
14	0.1	1.5	0.1	1.5	0.0	1.0	2374.38 efg	24.94 kl
15	0.25	1.5	0.25	1.5	0.1	0.0	1190.75 k	20.33 r
16	0.25	1.5	0.25	1.5	0.0	1.0	865.22 l	16.27 t
17	0.5	1.5	0.5	1.5	0.1	0.0	955.94 l	18.32 s
18	0.5	1.5	0.5	1.5	0.0	1.0	1761.13 i	21.12 q
19	0.0	0.5	0.0	0.5	0.1	0.0	2374.80 efg	25.53 jk
20	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	1.0	2223.63 gh	28.14 fg
21	0.0	1.0	0.0	1.0	0.1	0.0	2812.13 d	25.86 ij
22	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1712.63 i	23.79 n
23	0.0	1.5	0.0	1.5	0.1	0.0	3504.88 d	31.45 c
24	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	1.0	2271.63 gf	22.51 o
25	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	2805.88 d	28.56 ef
26	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	1.0	2352.63 efg	27.62 gh
27	0.25	0.0	0.25	0.0	0.1	0.0	2836.25	31.53 c
28	0.25	0.0	0.25	0.0	0.0	1.0	3252.25 c	32.93 b
29	0.5	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	1782.50 c	24.56 lm
30	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	1.0	2456.88 ef	27.25 h
LSD 0.05							**197.06**	**0.56**

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

4.3. Deney II'de Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

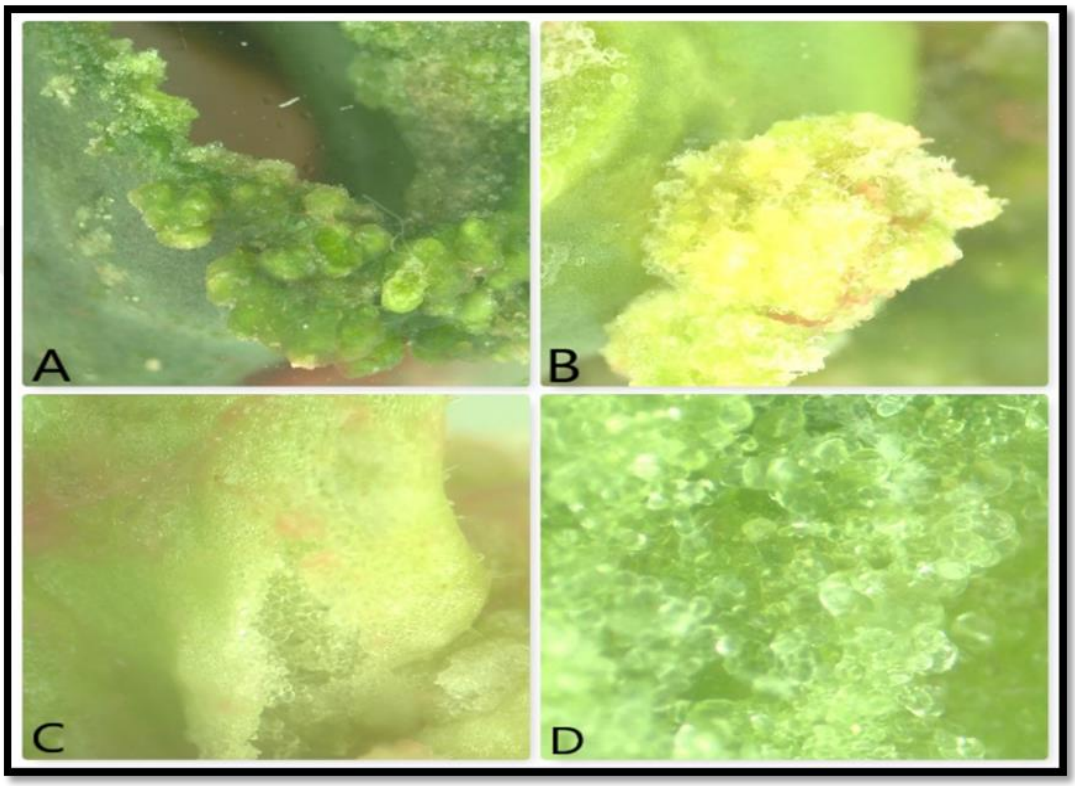
4.3.1. Kallus Oluşumu

Bu deneyde kallus indüksiyonu için dört farklı BBD kombinasyonu çalışılmıştır. Bu gruplar; BAP + NAA, BAP + 2,4-D, TDZ + NAA ve TDZ + 2,4-D grubu olmuştur. Kültüre alınan eksplantların genelinde ilk haftada en boy olarak 1 ile 4 arasında değişen katlarda büyüme ve gelişme gözlenmiştir (Şekil 4.5). Kallus oluşumu bazı eksplantlarda açık yara bölgelerinde meydana gelirken bazılarında ise eksplantın yüzeyinde, dokunun yeniden farklılaşarak kallusa dönüşmüştür (Şekil 4.6). Her gruba ait kallus oluşum bulguları ayrı başlıklar altında verilmiştir. BAP – NAA ve BAP – 2,4-D grupları için ilk kallus oluşumu kotiledon, hipokotil ve kotiledon çeneği eksplantlarında 2 haftanın sonunda gözlemlenirken, TDZ – NAA ve TDZ – 2,4-D gruplarında ilk kallus oluşumu 2 haftanın sonunda hipokotillerde ve kotiledon çeneklerinde hafif düzeyde kallus oluşumu gözlemlenmiş, ancak kotiledonlarda 4 haftanın sonunda çok hafif bir miktarda meydana gelmiştir. Kontrol gruplarında kallus oluşumu gözlenmemiştir.

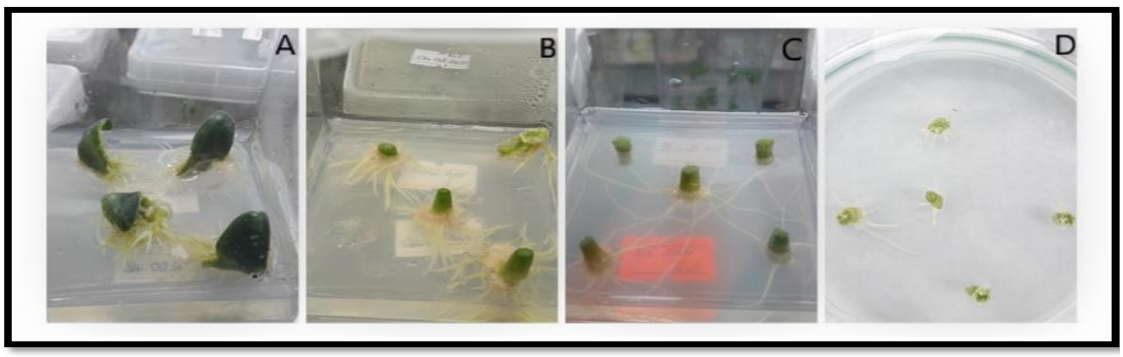


Şekil 4.5. BAP (3 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) destekli MS ortamında eksplant tiplerinin kültüre alınması; kotiledon (**A**), kotiledon çeneği (**B**), hipokotil (**C**). 2.haftadaki gelişimleri; **D**: kotiledon, **E**: kotiledon çeneği, **F**: hipokotil. Eksplantların 3.haftadan sonraki kallus gelişimleri; kotiledon (**G**), kotiledon çeneği (**H**), hipokotil (**I**)

Kallus oluşumunun dışında, 2.haftada oksin tiplerinin düşük dozlarında (NAA 0.05, 0.1, 0.5 mg/l ve 2,4-D 0.1, 0.5 mg/l) tek başlarına kullanıldığında bazı eksplant tiplerinde, genellikle hipokotil ve kotiledon çeneğinde köklenmeyi teşvik ettiği gözlenmiştir. Ancak 2,4-D'nin 1 mg/l konsantrasyonun kullanımında eksplantlarda kök oluşumu gözlenmemiştir. BBD kullanılmayan kontrol grubunda da aynı şekilde kallus oluşumu meydana gelmezken, köklenme gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. A: Kotiledon; açık yara dokusunda kallus oluşumu (1 mg/l BAP), B: Kotiledon eksplantı yüzeyinde kallus oluşumu (4.hafta, 3 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D), C: Kotiledon çeneği; dokunun yeniden farklılaşıp kallusa dönüşmesi (4.hafta, 3 mg/l BAP), D: Hipokotil; kallus görünümü, 40x (3 mg/l BAP)



Şekil 4.5. Deney I'de 2 haftada sonunda eksplant tiplerinde meydana gelen köklenme; A: kotiledon (0.05 mg/l NAA), B: hipokotil (0.05 mg/l NAA), C: hipokotil (0.1 mg/l 2,4-D), D: hipokotil (kontrol, BBD içermez)

4.3.1.1. BAP – NAA Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna Etkisi

Çalışmada BBD'nin eksplant tiplerinin üzerindeki kallus oluşturma etkisi istatistiki olarak önemli bulunurken, tekerrür, eksplant tipi ve BBD x eksplant tipi interaksiyonu üzerinde etkisi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Deney II'de eksplantlarda kallus oluşumuna ait varyans analizi

Kaynak	**SD**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F değeri**
Tekerrür	1	129.87983	129.87983	1.23 öd
BBD	15	43217.39270	2881.15951	27.22*
Eksplant tipi (E)	2	53.63418	26.81709	0.25 öd
BBD interaksiyonu x E	30	2638.88434	87.96281	0.83 öd
Hata	32	3387.31008	105.85344	
Genel Toplam	**80**	**49427.10113**		
VK (%)	**12.86003**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

En yüksek kallus oluşumu %100 gibi oldukça çok yüksek bir oran ile 6 nolu (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), 8 nolu (2 mg/l BAP), 11 nolu (2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA), 12 nolu (3mg/l BAP), 14 nolu (3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ve en düşük oranda kallus oluşumu ise %89.26 ile 2 nolu (0.1 mg/l NAA) ortamlarda gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Ortamlardaki kallus oluşum oranları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Her 3 eksplant tipinde de kallus oluşumu meydana gelmiştir. Eksplant tiplerinde sırasıyla en yüksek kallus oluşum oranları; kotiledonda %97.44, hipokotilde %97.12 ve kotiledon çeneğinde %96.36 olmuştur ancak kallus oluşum oranları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.7).

BAP – NAA grubunda kültüre alınan tüm eksplant tiplerinde kallus oluşumu 2 hafta aradan sonra başlamış ve 3 ila 4 hafta aradan sonra eksplantlarda genellikle büyük miktarda kallus yığını gözlenmiştir. Eksplantlarda meydana gelen kallus oluşum oranları 4.haftanın sonunda değerlendirilmiştir. Bu grupta meydana gelen kalluslar genellikle büyük miktarlarda, yeşil-yeşilimsi renklerde, üzerlerinde nodüller bulunan, sert veya granüler, kolay dağılabilen bir yapıda olurken, sadece NAA bulunan ortamlarda oluşan

kallus eksplant yüzeylerinde veya alt kısımlarında oluşmuş, çok az bir miktarda, beyaz renkte granüler, tanecikli ve kolay dağılır bir tipte olmuştur. Kallus oluşumunun dışında, 2.haftada oksin tiplerinden NAA tek başına düşük dozlarda (0.05, 0.1, 0.5 mg/l) kullanıldığında bazı eksplant tiplerinde, genellikle hipokotil ve kotiledon çeneğinde köklenmeyi teşvik ettiği ve 3.haftada ise tüm eksplant tiplerinde kök sayısında ve oranında çok yüksek bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Deney II'de BAP – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi

BBD (mg/l)			**Kallus oluşum oranı (%)**	
No	**BAP**	**NAA**	**Açı trans**	**%**
1	0.0	0.0	0.0	0.0 c
2	0.0	0.05	81.14	97.63 ab
3	0.0	0.1	70.87	89.26 b
4	0.0	0.5	79.03	96.38 b
5	1.0	0.0	85.57	99.40 a
6	1.0	0.05	85.57	99.40 a
7	1.0	0.1	90.0	100 a
8	1.0	0.5	85.57	99.40 a
9	2.0	0.0	90.0	100 a
10	2.0	0.05	85.57	99.40 a
11	2.0	0.1	85.57	99.40 a
12	2.0	0.5	90	100 a
13	3.0	0.0	90	100 a
14	3.0	0.05	85.57	99.40 a
15	3.0	0.1	90.0	100 a
16	3.0	0.5	85.57	99.40 a
LSD 0.05			**11.98**	

*Yüzde değerlerine açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.
Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

Çizelge 4.7. Deney II'de BAP - NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının **e**ksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi

Kallus Oluşma Oranı (%)			(açı trans.)*		
Kotiledon	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**
97.44 a	97.12 a	96.36 a	80.79	80.22	78.99
LSD 0.05			**5.24**		

*Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir.

4.3.1.2. BAP – 2,4-D Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna Etkisi

Çalışmada BBD, istatistiki anlamda önemli bulunmasına karşın, tekerrür, eksplant tipi ve BBD x eksplant tipi interaksiyonu önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.5. Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşum etkisine ait varyans analizi

Kaynak	**SD**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F değeri**
Tekerrür	1	368.51870	368.51870	3.50 öd
BBD	15	49935.33565	3329.02238	31.58*
Eksplant tipi (E)	2	881.38028	440.691014	4.18 öd
BBD interaksiyonu x E	30	6841.89604	228.06320	2.16 öd
Hata	32	3372.80756	105.40024	
Genel Toplam	**80**	**61399.93823**		
VK (%)	**12.88971**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

Çalışmada, Çizelge 4.9'da da görüldüğü gibi, tüm ortamlarda kallus meydana gelmiştir. En yüksek oranda kallus oluşumu % 100 oranında 2 nolu (0.5 mg/l 2,4-D), 3 nolu (1 mg/l 2,4-D), 6 nolu (1 mg/l BAP + 0.5 mg/l 2,4-D), 7 nolu (1 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D), 8 nolu (2 mg/l BAP), 9 nolu (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D), 11 nolu (2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D), 12 nolu (3 mg/l BAP) ve 15 nolu (3 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D) ortamlarda görülürken, en düşük kallus oluşumu ise %61.27 oranıyla 1 nolu (0.1 mg/l 2,4-D) ortamda gözlenmiştir. Ortamlardaki kallus oluşum oranları arasındaki farklılık istatistiki anlamda

önemli bulunmuştur (Çizelge 4.9). Her 3 eksplant tipinde de kallus meydana gelmiştir. Eksplant tipleri ve kallus oluşum oranları; kotiledonda %98.76, kotiledon çeneğinde %96.41 ve hipokotilde % 94.36 olmuştur. Eksplant tipleri arasındaki kallus oluşum oranları arasındaki fark istatistiki anlamda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi

BBD (mg/l)			**Kallus oluşum oranı**	
No	**BAP**	**2,4-D**	**Açı trans**	**%**
1	0.0	0.0	0.0	0.0 d
2	0.0	0.1	51.51	61.27 c
3	0.0	0.5	90	100 a
4	0.0	1.0	90	100 a
5	1.0	0.0	85.57	99.40 ab
6	1.0	0.1	85.57	99.40 ab
7	1.0	0.5	90	100 a
8	1.0	1.0	90	100 a
9	2.0	0.0	90	100 a
10	2.0	0.1	90	100 a
11	2.0	0.5	70.57	88.94 b
12	2.0	1.0	90	100 a
13	3.0	0.0	90	100 a
14	3.0	0.1	85.57	99.40 ab
15	3.0	0.5	85.57	99.40 ab
16	3.0	1.0	90	100 a
LSD 0.05			**16.738**	

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

Çizelge 4.10. Deney II'de BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının **e**ksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi

Kallus Oluşma Oranı (%)			**(açı trans.)***		
Kotiledon	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**
98.76 a	94.36 b	96.41 ab	83.61	76.26	79.07
LSD 0.05			**5.22**		

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir *Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir.

4.3.1.3. TDZ – NAA Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna Etkisi

Bu çalışmada kallus oluşumu heterojen bir dağılım göstermiştir. En yüksek kallus oluşumu %18.63 oranıyla 5 nolu (0.1 mg/l TDZ) ortamda meydana gelmiştir (Çizelge 4.11). Hipokotil eksplant tipinde %6.8 oranında kallus oluşumu görülürken, kotiledon çeneğinde %0.02 ve kotiledonda ise kallus oluşumu tespit edilmemiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.11. Deney II'de TDZ – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi

BBD (mg/l)			**Kallus oluşum oranı (%)**	
No	**TDZ**	**NAA**	**Açı trans**	**%**
1	0.0	0.0	0.0	0.0 c
2	0.0	0.5	0.0	0.0 c
3	0.0	1.0	10.97	3.62 b
4	0.0	1.5	6.54	1.30 bc
5	0.1	0.0	25.57	18.63 a
6	0.1	0.5	4.43	0.60 a
7	0.1	1.0	6.54	1.30 bc
8	0.1	1.5	4.43	0.60 bc
9	0.25	0.0	0.0	0.0 c
10	0.25	0.5	8.86	2.37 bc
11	0.25	1.0	4.43	0.60 bc
12	0.25	1.5	4.43	0.60 bc
13	0.5	0.0	0.0	0.0 c
14	0.5	0.5	8.86	2.37 bc
15	0.5	1.0	0.0	0.0 c
16	0.5	1.5	0.0	0.0 c
LSD 0.05			**10.62**	

*Yüzde değerlerine açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.
Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

Çizelge 4.12. Deney II'de TDZ – NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarının **e**ksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi

Kallus Oluşma Oranı (%)			**(açı trans.)***		
Kotiledon	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**
0.00 b	6.80 a	0.02 b	0.0	15.11	0.83
LSD 0.05			**4.60**		

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir *Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir

4.3.1.4. TDZ – 2,4-D Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Kallus Oluşumuna Etkisi

Bu çalışmada kallus oluşum oranı %5 – 50 arasında olmuştur. En yüksek kallus oluşturan ortamlar sırasıyla 4 nolu (1 mg/l 2,4-D), 12 nolu (0.25 mg/l TDZ + 1 mg/l 2,4-D), 3 nolu (0.75 mg/l 2,4-D) ve 10 nolu (0.25 mg/l TDZ + 0.5 mg/l 2,4-D) ortamda meydana gelirken en düşük kallus oluşumu ise 15 nolu (0.5 mg/l TDZ + 0.75 mg/l 2,4-D) ortamda %5.11 oranında meydana gelmiştir. Bazı ortamlarda, kontrol grubu dahil, kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.13). Eksplant tiplerinde en yüksek kallus oluşumu %32.21 ile hipokotilde gözlenirken, kotiledon çeneğinde %11.35 ve kotiledonda ise %1.2 oranında gözlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.13. Deney II'de TDZ – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi

BBD (mg/l)			**Kallus oluşum oranı (%)**	
No	**TDZ**	**2,4-D**	**Açı trans**	**%**
1	0.0	0.0	0.0	0.0 e
2	0.0	0.5	30.0	25.0 bc
3	0.0	0.75	38.46	38.68 ab
4	0.0	1.0	45.0	50.0 a
5	0.1	0.0	25.57	18.83 c
6	0.1	0.5	0.0	0.0 e
7	0.1	0.75	13.99	5.84 d
8	0.1	1.0	0.0	0.0 e
9	0.25	0.0	0.0	0.0 e
10	0.25	0.5	37.07	36.34 ab
11	0.25	0.75	32.11	0.60 bc
12	0.25	1.0	39.0	39.60 ab
13	0.5	0.0	0.0	0.0 e
14	0.5	0.5	32.24	31.63 bc
15	0.5	0.75	13.07	5.11 d
16	0.5	1.0	13.99	5.84 d
LSD 0.05				**9.68**

*Yüzde değerlerine açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

Çizelge 4.14. Deney II'de TDZ – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının **e**ksplant tiplerinde kallus oluşumuna etkisi

Kallus Oluşma Oranı (%)			**(açı trans.)***		
Kotiledon	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**
1.20 c	32.21 a	11.35 b	6.20	34.58	19.69
LSD 0.05			**4.47**		

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir *Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir

4.3.1.5. Kallus Oluşum Bulgularının Genel Değerlendirilmesi

5 günlük fidelerden elde edilen kotiledon, hipokotil ve kotiledon çeneği olan eksplantlar ile başlatılan bu çalışmada kallus indüksiyonu için çeşitli oksin ve sitokinin türevleri olan BAP, TDZ, NAA ve 2,4-D kullanılarak oluşturulan BAP + NAA, BAP + 2,4-D, TDZ + NAA ve TDZ + 2,4-D gruplarında kallus oluşum oranları sırasıyla en düşükten en yükseğe; BAP + NAA için %89.26 – %100, BAP + 2,4-D için %61.27-100, TDZ + NAA için %0–18.63 ve TDZ + 2,4-D için ise %0-39.60 arasında gerçekleşmiştir. Eksplant tiplerinde kallus oluşum oranları: BAP – NAA grubunda; kotiledon %97.44, hipokotil %97.12 ve kotiledon çeneği %96.36. BAP – 2,4-D grubunda; kotiledon %98.76, hipokotil %94.36 ve kotiledon çeneği %96.41. TDZ – NAA grubunda; kotiledon %0, hipokotil %6.8 ve kotiledon çeneği %0.02. TDZ – 2,4-D grubunda ise kotiledon %1.2, hipokotil %32.21 ve kotiledon çeneği %11.35 oranında kallus oluşturmuştur. Her 4 gruptaki kallus oluşum oranlarına dikkat edildiğinde sitokinin tiplerinin kallus indüksiyonu üzerinde farklı etkilerinin olduğu görülmektedir. BAP, NAA veya 2,4-D ile kullanıldığında her 3 eksplant tipinde de çok yüksek oranlarda kallus oluşumu sağlarken, BAP yerine TDZ kullanıldığında kallus oluşum oranlarında çok yüksek bir düşüş meydana gelmiştir. TDZ bulunan ortamda kotiledon ve kotiledon çeneği eksplantlarında neredeyse hiç kallus oluşmazken, hipokotilde %32.21 oranında oluşmuştur. TDZ ile 2,4-D birlikte kullanıldığında TDZ + NAA kombinasyonundan daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak Deney I ile Deney II kıyaslandğında, 20-günlük kotiledon kesitlerinde TDZ tek başına veya NAA ile beraber kullanımıyla %100 gibi oldukça çok yüksek bir oranda kallus indüksiyonu gerçekleşirken, TDZ + 2,4-D kombinasyonunda kallus oluşumu meydana gelmemiştir. TDZ'nin tek başına veya NAA ile birlikte kullanıldığında, eksplantların yaş bakımından etkisine bakıldığında, daha yaşlı olan

eksplantlarda daha etkili olduğu gözlenmiştir. Raji ve ark. (2018), kokulu kavunda (*Cucumis melo L.)* kallus başlatmak için kullanmış olduğu NOA (0.4 mg/l) + BAP (0.2 mg/l) ve NOA (0.2 mg/l) + TDZ (0.18 mg/l) kombinasyonlarında sırasıyla; %86 ve %82 oranında, eksplant tipi ve yaşı baz alındığında ise 8-günlük kotiledonda %54, 4-günlük kotiledonda ise %46 oranında kallus elde etmişlerdir**.** Çalışmamızda TDZ + 2,4-D kombinasyonunda en yüksek kallus oranı %39.6, eksplant bazında ise en yüksek kallus oran hipokotilde görülürken, kotiledon ve kotiledon çeneğinde bu oran çok düşük olmuştur. Bunun sebebi, genotip, eksplant yaşı veya BBD etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. BBD içermeyen kontrol grubunda kallus oluşumu meydana gelmezken bazılarında köklenme gözlenmiştir. BBD'nin kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis için gerekli olduğunu göstermektedir ki benzer sonuçları, Zhang ve ark. (2014) da bildirmişlerdir. BBD içermeyen ortamda kültüre alınan kavun eksplantlarında kallus oluşumunun BBD eksikliğinden dolayı gerçekleşmediği Yuan (2007) tarafından rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2014). Zhang ve ark. (2014), *Citrullus lanatus*'un 3 farklı çeşidinde 5-günlük eksplantlar ile yapmış oldukları somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyon çalışmasında, kallus oluşumu için kullandıkları BAP + NAA kombinasyonlarında elde ettikleri en yüksek kallus oluşum oranını %97.8 ile BAP (2 mg/l) + NAA (1 mg/l), en düşüğünü ise %75.6 ile BAP (4 mg/l) + NAA (0.05 mg/l) ve BAP + 2,4-D kombinasyonlarında ise; en yüksek kallus oluşumu %98.9 ile 2 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D ve en düşüğü ise %87.8 oranıyla 4 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Aynı şekilde kotiledon, kotiledon çeneği ve hipokotil eksplantlarında sırasıyla %88.9, %96.7 ve %98.9 oranında kallus elde edilmiştir. Ancak hem BAP + NAA hem de BAP + 2,4-D gruplarında en yüksek oranlarda elde ettikleri kallus tipi non-embriyogenik kallus tipi olmuştur. Bu ortamlarda kullanılan oksin ve sitokinin tipleri incelendiğinde, oksin miktarı artıkça embriyogenik kallusun oranının azaldığı, NAA için 1 mg/l ve 2,4-D için 2 mg/l konsantrasyonunda tamamen non-embriyogenik yapısına dönüştüğü görülmüştür. Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir. Khatun ve ark. (2010), karpuzda (*Citrullus lanatus* Thumb.) kallus indüksiyonu için kotiledon ve internod eksplantları BAP, 2,4-D ve NAA konsantrasyon ve kombinasyonları bulunan MS ortamında kültüre alınmış ve en yüksek kallus indüksiyonu 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Song ve ark. (2007), karpuzda kallus başlatmak için kullandıkları BAP + NAA kombinasyonları ile

kallus oluşumu gerçekleştirmişlerdir. Chaturvedi ve Bhatnagar (2001), Sugar Baby çeşidi karpuzda kallus oluşumu için 7-günlük kotiledon eksplantları BA, 2iP, IAA ve NAA'nın farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını kullanarak kültüre almış ve en yüksek kallus oluşum oranını % 100 ile BA (0.68-1.13 mg/l) + IAA (0.53-0.88 mg/l) kombinasyonlarında ve BA (0.23-2.25 mg/l) + NAA (0.19-1.86 mg/l) kombinasyonlarında ise %0-83.2 arasında kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Urbanek ve ark. (2004), Styrian kabağında kallus indüksiyonu için BAP + NAA kombinasyonunu kullanmış ve kallus elde etmişlerdir. Usman ve ark. (2011), hıyarda somatik embriyogenesis ve sürgün rejenerasyon çalışmasında çeşitli BAP + NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarını MS ortamında kullanmışlardır. Kotiledon eksplantında, sadece BAP (1 mg/l) destekli MS besi ortamında en yüksek kallus oluşum oranı %64, sadece 1-1.5 mg/l, NAA destekli MS besi ortamında ise %63, BAP (5 mg/l) + NAA (1 mg/l) kombinasyonu için %77 ve 2 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında %89.5 oranında elde ettikleri en yüksek kallus oluşum oranı olmuştur. Ancak elde ettikleri sonuçlar bizim elde ettiğimiz oranlardan daha düşük olmakla birlikte paralellik göstermektedir. El-Sayed el-absawy ve ark. (2012), aynı şekilde hıyarda (*Cucumis sativus L. cv. Faris*) kallus jenerasyonu için BAP, Kin, 2,4-D ve NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarını kullanmışlardır. Kallus oluşumu sadece bazı ortamlarda meydana gelmekle birlikte en yüksek kallus oluşum oranını %92 ile 1 mg/l 2,4-D ortamında kültüre alınan yaprak kotiledon eksplantından elde etmişlerdir. Ayrıca çok düşük oksin konsantrasyonlarının kallus oluşturma oranı, yaş kallus ağırlığı, somatik embriyo oluşumu ve kallus farklılaşması için çok gerekli olduğunu gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Çalışmamızdaki bulgulara kıyasla çok daha düşük oranlarda kallus elde etmiş olsalar da paralellik söz konusudur.

4.3.2. Embriyogenik Kallus Oluşumu

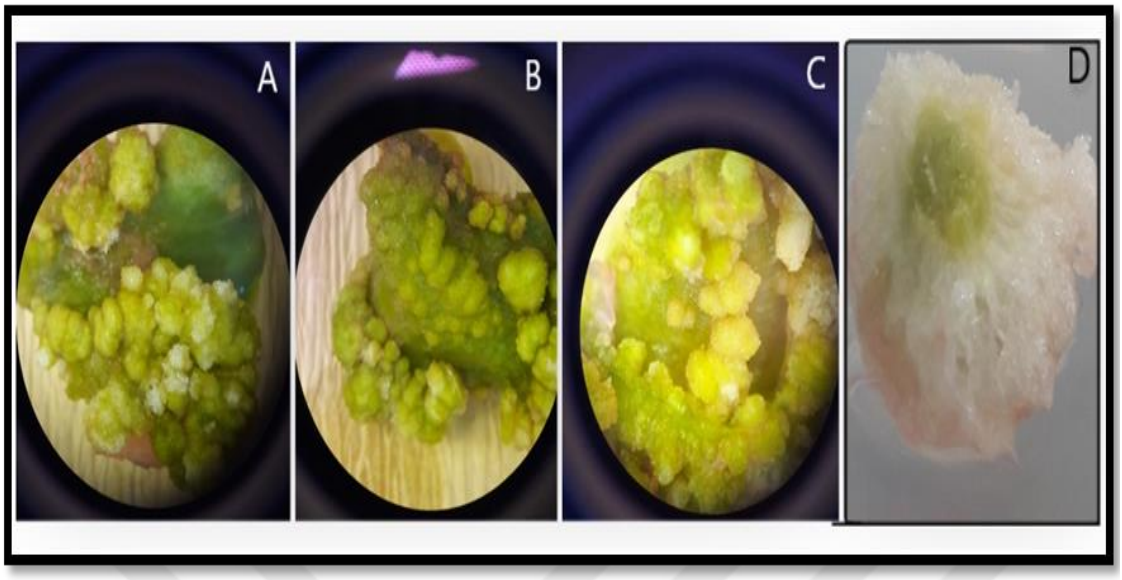
Embriyogenik kallus somatik embriyo geliştirme potansiyeline sahip olan kallus tipidir. Bu çalışmada tüm somatik embriyolar embriyogenik kallustan meydana gelmiştir. Çalışmada BBD, tekerrür, eksplant tipi ve BBD x Eksplant tipi interaksiyonu embriyogenik kallus oluşumu üzerinde etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Deney II'de embriyogenik kallus oluşumuna (%) ait varyans analizi

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Tekerrür	1	4840.3175	4840.3175	25.72 *
BBD	61	198883.9927	6415.6127	34.09*
Eksplant tipi (E)	2	23877.6781	11938.8390	63.45 *
BBD interaksiyonu x E	62	73673.3637	1188.26801	6.31 *
Hata	64	12043.0896	188.1733	
Genel Toplam	**160**	**313318.4416**		
VK (%)	**35.35362**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

BAP – NAA ve BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarında meydana gelen kalluslar embriyogenik yapıda oldukları, binoküler mikroskop ile belirli aralıklarda yapılan gözlemler sonucu açığa çıkarılmıştır. Embriyogenik kallus içinde veya üzerinde proembriyoid veya proembriyogenik yığın bulunan ve granüler, kırılgan, kompakt, şeffaf bir yapıda ve renk olarak da yeşil-yeşilimsi, sarımsı ve beyaz renklerde olabilmektedir. Embriyogenik olmayan kallus ise yumuşak, çok kolay dağılabilen gevşek bir yapıda veya kompakt, yeşilimsi, beyaz ve kahvrenkli olabilmektedir (Şekil 4.8). Embriyogenik kallus kültüre alındığında gelişim gösterip embriyolar oluştururken, embriyogenik olmayan kallusta embriyo oluşumu söz konusu değildir. TDZ + NAA veya 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarında sadece bazı ortamlarda kallus oluşumu gözlemlenmiş ancak oluşan kalluslar embriyogenik gelişim göstermemiştir. Somatik embriyolar embriyogenik olan bu kallus tiplerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.6. 6.haftada kotiledon eksplantlarında embriyogenik kallus oluşumu (**A**: 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, **B**: 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, **C**:2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ve 4.haftada hipokotil eksplantında embriyogenik olmayan kallus (**D**: 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D)

Çizelge 4.16. Deney II'de BAP –NAA - 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının eksplant tiplerinde embriyogenik kallus oluşumuna etkisi

Embriyogenik Kallus Oluşma Oranı (%)			**(açı trans.)***		
Kotiledon	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**
63.23 a	18.35 c	38.52 b	52.67	25.37	38.37
LSD 0.05			**4.84**		

*Açı transformasyonu uygulanmış % değerleridir

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

En yüksek embriyogenik kallus oluşum yüzdeleri sırasıyla %100 ile 5 nolu (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), 6 nolu (2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA) ve 8 nolu (3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamlarda, %99.4 ile de 2 nolu (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamında gözlemlenirken, %0.6 ile en düşük olanı ise 24 nolu (3 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D) ortamda gözlemlenmiş ve 10, 11, 12, 21, 25, 26, 27 nolu ortamlarda ise embriyogenik kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.17). Eksplant tiplerinde, BAP – NAA ve 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının tümü için en yüksek oran % 63.23 ile kotiledon, bunu sırasıyla %38.52 ile kotiledon çeneği ve %18.35 ile hipokotil izlemiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.17. Deney II'de BAP – NAA – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarının embriyogenik kallus oluşumuna etkisi

	BBD (mg/l)			**Embriyogenik kallus oluşum oranı**	
No	**BAP**	**NAA**	**2,4-D**	**Açı trans.**	**%**
1	1.0	0.05	0.0	74.61	92.95 ba
2	1.0	0.1	0.0	85.57	99.40 a
3	1.0	0.5	0.0	62.52	78.71 b
4	2.0	0.05	0.0	85.0	99.24 b
5	2.0	0.1	0.0	90.0	100.0 a
6	2.0	0.5	0.0	90.0	100.0 a
7	3.0	0.05	0.0	67.11	84.87 b
8	3.0	0.1	0.0	90.0	100.0 a
9	3.0	0.5	0.0	60.0	75 bc
10	0.0	0.05	0.0	0.0	0.0 h
11	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0 h
12	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0 h
13	1.0	0.0	0.0	40.57	42.30 de
14	2.0	0.0	0.0	45.0	50.0 dc
15	3.0	0.0	0.0	60.0	75.0 bc
16	1.0	0.0	0.1	46.67	52.91 dc
17	1.0	0.0	0.5	25.55	18.61 fe
18	1.0	0.0	1.0	24.82	17.62 fe
19	2.0	0.0	0.1	68.21	86.21 b
20	2.0	0.0	0.5	16.84	8.40 fg
21	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0 h
22	3.0	0.0	0.1	45.0	50.0 dc
23	3.0	0.0	0.5	17.50	9.05 fg
24	3.0	0.0	1.0	4.43	0.60 hg
25	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0 h
26	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0 h
27	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0 h
28	1.0	0.0	0.0	40.57	42.30 de
29	2.0	0.0	0.0	45.0	50 dc
30	3.0	0.0	0.0	60.0	75 bc
LSD 0.05				**16.20**	

*Yüzde değerlerine açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

4.3.3. Eksplant Başına Somatik Embriyo Sayısı (adet/kallus)

Bu çalışmada SAS istatistik programıyla yapılan varyans analiz sonucuna göre embriyogenik kalluslardan meydana gelen ortalama somatik embriyo sayısı üzerine BBD, eksplant tipi, BBD x eksplant tipi interaksiyonu %0.01 düzeyinde önemli bulunurken tekerrür önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Deney II'de elde edilen ortalama embriyo sayısı varyans analizi

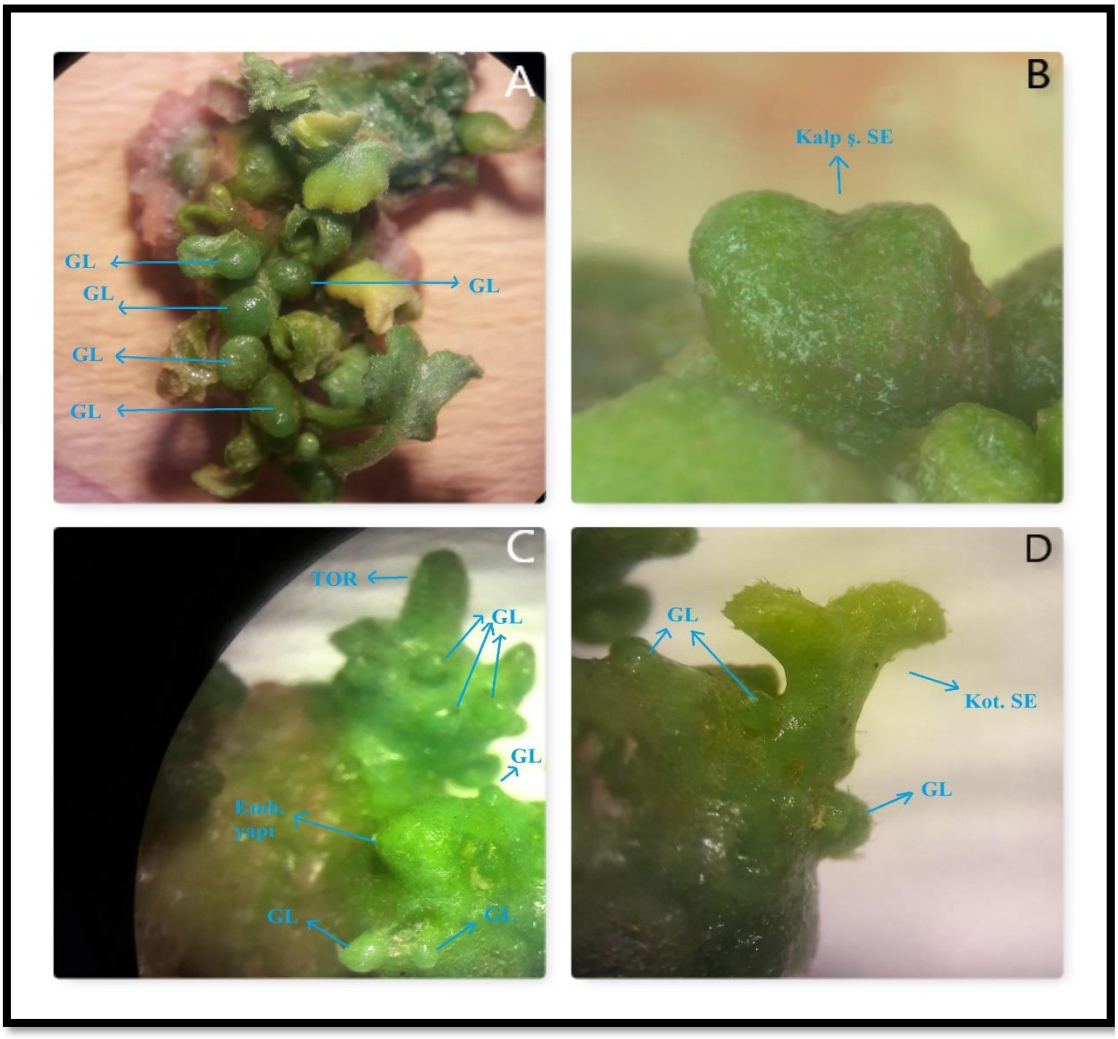
Kaynak	**SD**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F değeri**
Tekerrür	1	0.0094081	0.0094081	0.17 öd
BBD	27	200.0951973	7.4109332	132.06*
Eksplant tipi (E)	2	86.5412655	43.2706327	771.05 *
BBD interaksiyonu x E	54	192.2862345	3.5608562	63.45*
Hata	56	3.1426699	0.0561191	
Genel Toplam	**140**	**482.0747753**		
VK (%)	**11.62750**			

*, %0.01 düzeyinde önemli, öd, önemli değil.

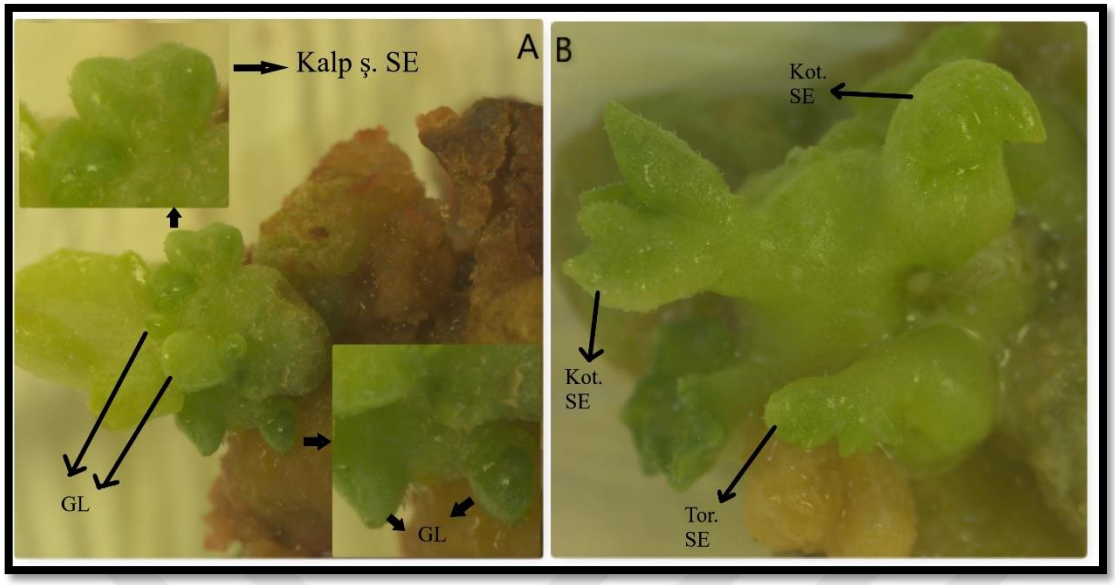
BAP – NAA ve BAP – 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarında meydana gelen kallusların farklılaşarak embriyogenik kallusa dönüşmüş ve ardından da bu farklılaşan embriyogenik kalluslardan somatik embriyolar meydana gelmiştir. Somatik embriyolar globular, kalp şekli, torpido ve kotiledon gibi farklı aşamalarda 5-12 haftalarda binoküler mikroskop altında tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Somatik embriyo sayımları binoküler mikroskop altında manuel olarak sayılıp kaydedilmiştir. Bazı kültürlerde somatik embriyogenesis 21 hafta boyunca sürdürülmüş ve farklı somatik embriyogenesis safhaları (kalp şekli, torpido ve kotiledon) tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

En yüksek ortalama somatik embriyo sayısı 62.6 adet ile 9 nolu (3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA) ortamda kültüre alınan kotiledon eksplantından elde edilirken hipokotil eksplantında en yüksek ortalama somatik embriyo sayısı 11.3 adet ile 4 nolu (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ortamda ve kotiledon çeneğinde ise 46.9 adet ile 3 nolu (1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA) ortamda meydana gelmiştir. Eksplant tipi farketmeksizin en yüksek ortalama somatik embriyo sayısı 23.2 adet ile BAP (3 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) içeren 9

nolu ortamda tespit edilirken 10, 11, 12, 13, 19, 22, 23, 24 ve 25 nolu ortamlarda ise hiç embriyo oluşmamıştır (Çizelge 4.19).

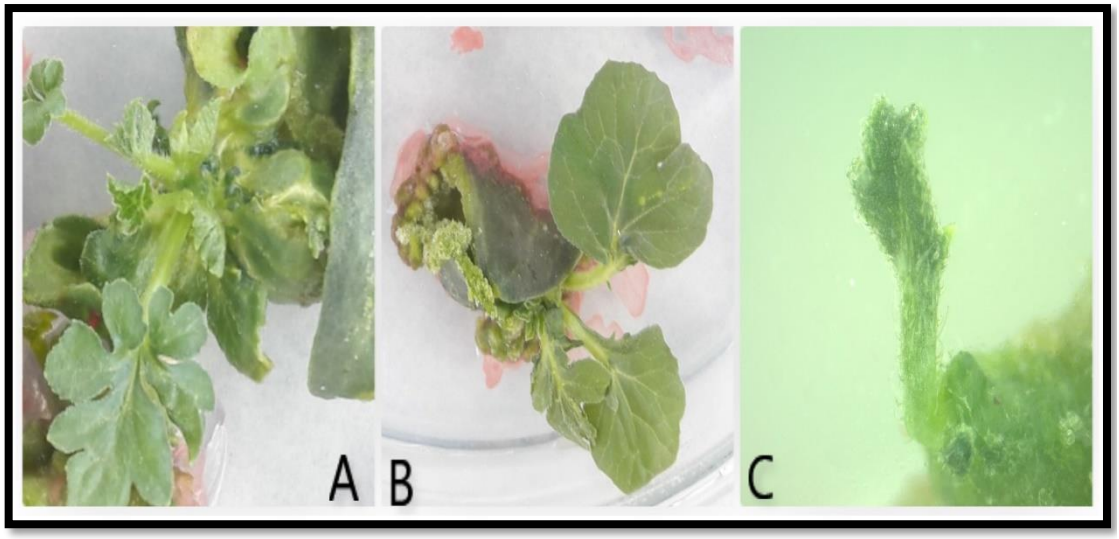


Şekil 4.7. Somatik embriyogenesis safhaları: Globular (GL) (A: 2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA,13.hafta), Kalp şekli (B: 1 mg/l BAP , 5.hafta), Torpido (C: Kotiledon çeneği, 2 mg/l BAP, 13.hafta), Kotiledon safhasındaki SE (D: kotiledon çeneği, 2 mg/l BAP, 13.hafta)



Şekil 10. SE safhaları; **A:** Kalp şeklindeki SE, GL (globular embriyogenik doku.(3 mg/l BAP,17.hafta) **B:** Kotiledon safhasındaki SE, Torpido safhasındaki SE (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 21.hafta)

Bu çalışmada ayrıca, somatik embriyogenesisin yanı sıra bazı kültürlerde, organogenesis sonucu sürgün oluşumu da gözlenmiştir. Organogensisin indirekt olarak kallusların içinden veya yüzeyinde adventif sürgünler oluşturduğu yapılan gözlemler sonucu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kültürlerde organogenesis sonucu oluşan adventif sürgünler; **A:** 1 mg/l BAP, kotiledon, 6.hafta, **B:** 3 mg/l BAP, kotiledon, 6.hafta, **C:** 2 mg/l BAP, kotiledon, 5.hafta

Çizelge 4.6. Deney II'de BAP – NAA ve BAP - 2,4-D konsanstrasyon ve kombinasyonlarının embriyo sayısına etkisi

	BBD				**Kotiledon**	**Hipokotil**	**Kotiledon çeneği**	**Genel**
No	**BAP**	**NAA**	**2,4-D**	$\sqrt{O.E.S.}$	**O.E.S.**	**O.E.S.**	**O.E.S.**	**O.E.S.**
1	1.0	0.05	0.0	2.94 d	31.6	0.9	2.0	11.5
2	1.0	0.1	0.0	2.94 d	29.0	1.5	2.2	10.9
3	1.0	0.5	0.0	4.06 a	16.0	0.4	46.9	21.1
4	2.0	0.05	0.0	3.46 c	5.9	11.3	17.4	11.5
5	2.0	0.1	0.0	3.50 c	16.5	8.5	9.9	11.7
6	2.0	0.5	0.0	3.02 d	22.6	3.8	3.1	9.8
7	3.0	0.05	0.0	3.33 c	48.3	0.8	1.8	16.9
8	3.0	0.1	0.0	3.79 b	50.1	3.0	4.0	19.0
9	3.0	0.5	0.0	3.93 ab	62.6	0.0	6.9	23.2
10	0.0	0.05	0.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.0	0.1	0.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	0.5	0.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.0	0.0	0.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
14	1.0	0.0	0.1	1.28 i	0.3	1.6	0.2	0.7
15	1.0	0.0	0.5	1.16 ij	0.8	0.2	0.1	0.4
16	1.0	0.0	1.0	1.14 ij	0.7	0.1	0.1	0.3
17	2.0	0.0	0.1	1.94 h	6.2	3.2	0.2	3.2
18	2.0	0.0	0.5	1.07 ij	0.4	0.0	0.1	0.2
19	2.0	0.0	1.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
20	3.0	0.0	0.1	2.08 gh	15.2	0.2	0.3	5.2
21	3.0	0.0	0.5	1.09 ij	0.1	0.2	0.3	0.2
22	3.0	0.0	1.0	1.02 j	0.0	0.1	0.0	0.0
23	0.0	0.0	0.1	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	0.0	0.5	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	1.0	1.00 j	0.0	0.0	0.0	0.0
26	1.0	0.0	0.0	2.22 fg	17.9	0.0	0.8	6.2
27	2.0	0.0	0.0	2.47 ef	24.7	0.0	0.9	8.5
28	3.0	0.0	0.0	2.60 e	20.5	0.0	3.8	8.1
LSD 0.05				**0.25**				

* O.E.S : Ortalama embriyo sayısı, G.O: Genel ortalama embriyo sayısı: Her bir ortamdaki 3 eksplant tipinde meydana gelen ortalama somatik embriyo sayısı. Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

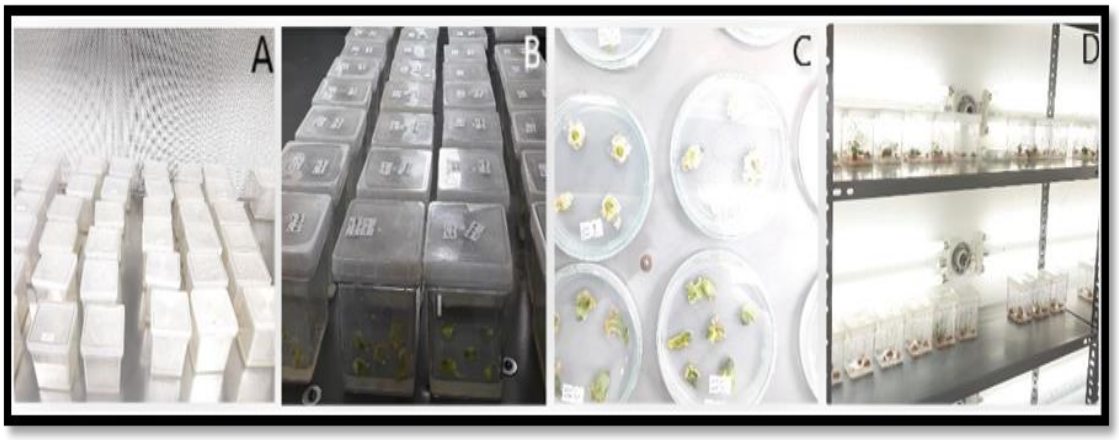
4.3.3.1. Embriyogenik Kallus ve Embriyo Oluşumu Genel Değerlendirme

Kültürlerde embriyogenik kallus oluşum oranları BAP + NAA grubunda %75-100 arasında görülürken, BAP + 2,4-D grubunda bu oran %0.6-86.21 arasında olmuştur. Eksplant başına ortalama embriyo sayısı BAP + NAA için 0 – 23.2 adet, BAP + 2,4-D için ise 0 – 5.2 adet olmuştur. Eksplant bazında sırasıyla; kotiledon 62.6 adet ile BAP (3 mg/l) + NAA (0.5 mg/l), kotiledon çeneği 46.9 adet ile BAP (1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) ve hipokotil 11.3 adet ile BAP (2 mg/l) + NAA (0.05 mg/l) içeren ortamda meydana gelmiştir. Hem embriyogenik kallus oranı hem de somatik embriyo sayısı bakımından en başarılı besi ortamı BAP + NAA içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. TDZ + NAA veya 2,4-D kombinasyonlarında meydana gelen kalluslar embriyogenik yapıya dönüşememiştir. Compton ve Gray (1993), karpuz (*Citrullus lanatus* (Thumb)) genotiplerinin olgunlaşmamış kotiledonlarını kullanarak, en yüksek oranda somatik embriyogenesisi 18-günlük olgunlaşmamış kotiledonun 10 µM (2.2 mg/l) 2,4-D + 0.5 µM (0.1 mg/l) TDZ içeren MS ortamında gerçekleştiğini rapor etmiştir. Ancak çalışmamızda, olgun tohum orjinli 5-günlük fidelerin kotiledon, hipokotil ve kotiledon eksplant tiplerinde TDZ yalnız veya NAA veya 2,4-D ile birlikte kullanıldığı ortamlarda embriyogenik kallus veya embriyo elde edilememiştir. Bunun, genotip ve eksplant yaşlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Zira, genetik farklılığın somatik embriyo oluşum kapasitesi üzerine etkili olduğu Oridate ve ark. (1992) tarafından bildirilmiştir. (Zhang ve ark. (2013), Birçok çalışmada SE'in BBD'nin tür ve konsantrasyonlarından etkilendiğinin belirtildiği Vasil (1984) tarafından rapor edilmiştir. Çalışmamızda kültür ortamlarına bakıldığında sadece oksin içeren ortamlarda embriyogenik kallus oluşumu ve dolayısıyla embriyo oluşumu da meydana gelmemiş ancak oksin tipleri olan NAA veya 2,4-D'nin BAP ile kombinasyonlarında embriyogenik kallus oluşumu ve bu kültürlerden embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Embriyogenik kallus gelişimi ve embriyo oluşumu için sitokinin kullanımının gerekli olduğu gözlenmiştir. Sitokininlerin gerekli olduğu Debeaujon ve Branchard (1993), SE'de faydalı olduğunu birçok araştırmacı tarafından kanıtlandığı da Zhang ve ark. (2013) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca BAP (1, 2 ve 3 mg/l) yalnız kullanıldığında da embriyogenik kallus ve embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Bunun endogenus oksin veya BBD sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bir çok bitkide somatik embriyogenesis için oksinin gerekli olduğunu George (1984) ve Dudits (1991) tarafından rapor edilmiştir

(Zhang ve ark. (2013). Ancak, çalışmamızda kullandığımız Diyarbakır karpuzu Sürme çeşidinde ekzogenus oksin olmaksızın sadece sitokinin bulunan MS besi ortamından embriyogenik kallus meydana gelmiş ve somatik embriyo elde edilmiştir. Kwack ve Fujieda (1988) tarafından, alışılmadık bir şekilde, kabakta (*Cucurbita moschata*) BBD kullanılmadan direkt somatik embriyogenesis elde ettikleri rapor edilmiştir (Debeaujon ve Branchard 1993). Jelaska (1974), kabakta (*Cucurbita pepo L.*) embriyogenesis ve organogenesis çalışmasında 2,4-D bulunan ortamda ne embriyogenik kallus ne de embriyo meydana geldiğini, ancak NAA, IAA ve IBA içeren ortamlarda embriyoların meydana gelip bitkiciklere dönüştüğünü rapor etmiştir. Araştırmacının bulguları, çalışmamızda 2,4-D'nin tek kullanıldığı konsantrasyonlarında ve NAA'nın BAP ile birlikte kullanıldığı kombinasyonlardan elde ettiğimiz sonuçlarla uyum içerisindedir.

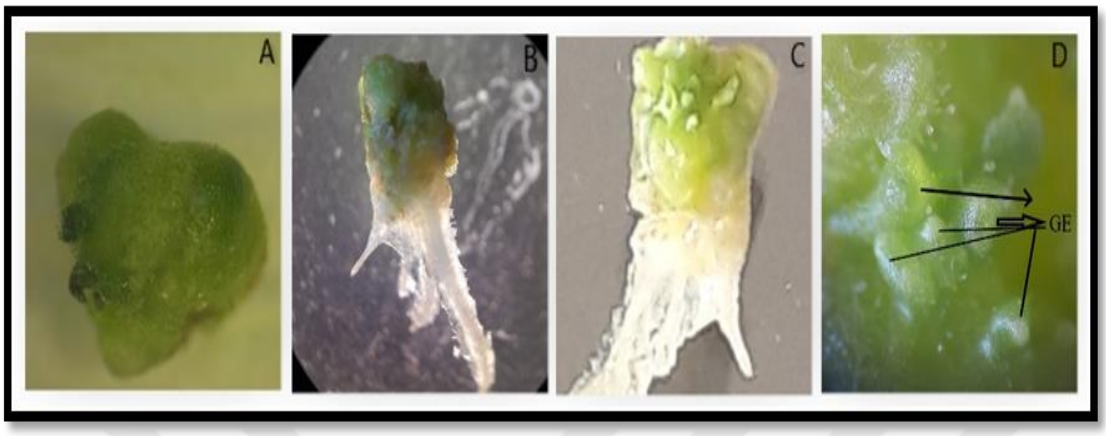
4.3.4. Somatik Embriyoların Olgunlaştırma, Çimlenme, Bitkiciklere Dönüşme ve Aklimatizasyon Oranları

Kültürler kallus başlatma ortamından 1.altkültüre alındıktan sonra 1. veya 2. haftadan itibaren meydana gelmeye başlayan embriyolar; genellikle proembriyogenik yığın ve globular olmak üzere, kalp, torpido ve kotiledon safhasına gelen embriyolar, embriyo olgunlaştırma ve çimlendirme ortamlarına transferi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12). İlk embriyo çimlenmesi, ilk kültür başlagıcından itibaren, 7 ila 8 hafta içerisinde gerçekleşmiştir. Embriyolar olgunlaştırılmak ve çimlendirilmek üzere IAA (1mg/l), Kin (1 mg/l) ve kontrol (BBDsiz) grubu dahil 3 farklı ortamda kültüre alınmıştır.



Şekil 4.8. Eksplantların kültüre alınması (A), birinci haftadan itibaren 16/8 ışık-karanlık fotoperiyotta kültürünün sürdürülmesi (B), 1.altkültüre alınması (C), embriyo olgunlaştırma, çimlendirme ortamlarına transfer edilip gelişimlerinin sürdürülmesi (D)

Ayrıca, olgunlaştırma ve çimlendirme ortamında kültüre alınan kalp şekli fazındaki somatik embriyoda ikincil somatik embriyogenesis gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.9. Kalp şeklindeki somatik embriyonun (A) olgunlaştıktan sonra çimlenmesi (B) ve ikincil somatik embriyogenesisin oluşumu (C-D), GE: Globular embriyo (C-D)

Çizelge 4.7. Somatik embriyoların çimlenme, bitkiciklere dönüşme ve aklimatize oranları

BBD (mg/l)	**Çimlenen embriyo/ Toplam embriyo sayısı** (adet)	**Çimlenme oranı** (%)	**B.D.SE.S / B.D.SE. oranı** (%)	**Aklimatizasyona alınan bitkicik sayısı** (adet)
Kontrol				
0.0	20/55	35.5	20/95.5	19
IAA				
1.0	29/55	52.7	29/80.2	23
Kin				
1.0	18/55	31.8	18/77.3	14

* S.D.SE S.: Bitkiciklere dönüşen somatik embriyo sayısı

* Çizelgede sunulan veriler çalışmanın orijinal verileri olup 2 tekerrür ortalamasına ait değerlerdir

Yukarıda Çizelge 4.20'de de görüleceği gibi en yüksek çimlenme oranı %52.7 ile IAA (1 mg/l) ortamında elde edilmiş, bunu sırasıyla %35.5 ile BBD içermeyen kontrol ortamı ve %31.8 Kin (1 mg/l) ortamı takip etmiştir. Embriyoların bitkiciklere dönüşme oranı açısından en yüksek oran %95.5 ile kontrol ortamında meydana gelirken bunu % 80.2 ile IAA (1 mg/l) ve %77.3 ile Kin (1 mg/l) içeren ortam takip etmiştir. Çizelge

4.20'de aklimatizasyona alınan bitkiciklerin sayısı sırasıyla 23 (IAA), 19 (kontrol) ve 14 adet (Kin) içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.14).

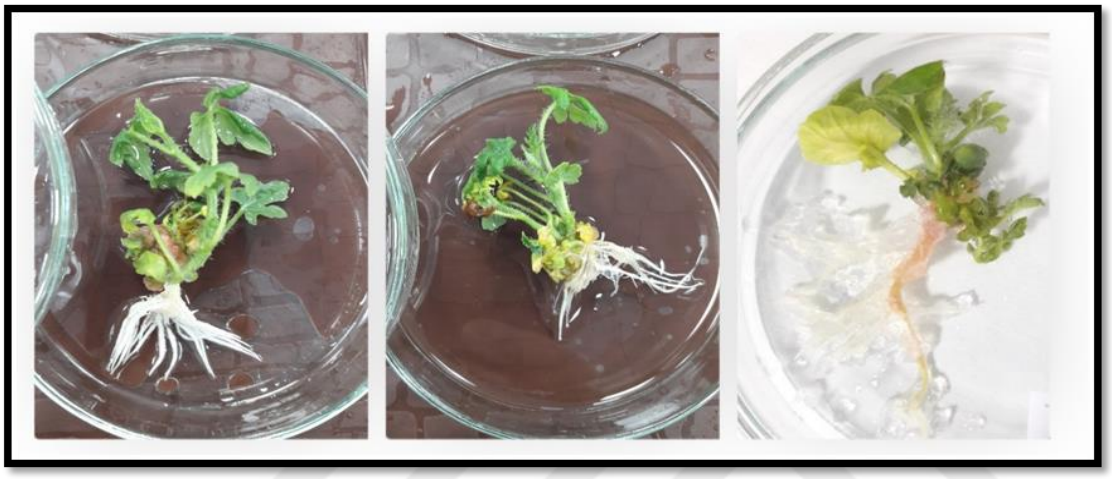


Şekil 4.10. Aklimatizasyona alınmaya başlanan bitkicikler (embling) ,steril torf ortamında

Kabakgillerde, globular safhadaki embriyolar olgunlaştırılmak için IAA (2 mg/l) içeren MS besi ortamında Juretic ve Jelaska (1991) tarafından kültüre alınmıştır (Urbanek ve ark. 2004). Urbanek ve ark. (2004) embriyo olgunlaştırma ve çimlendirme ortamı olarak IAA, NAA, GA_3 ve BA'nın yanı sıra BBD içermeyen MS besi ortamı da kullanmıştır. Aynı şekilde bu amaçla BBD içermeyen ortamları Cade ve ark. (1990); Compton ve Gray (1993); Gray ve ark. (1993); Lou ve Kako (1994); Chee (1995); Gonsalves ve ark. (1995); Naderi ve ark. (2011); El-Sayed el-absawy ve ark. (2012); Thiruvengadam ve ark. (2013); Vinoth ve Ravindhran (2016), oksin ve/veya sitokinin kombinasyonlarını ise Trulson ve Shahin (1986); Punja ve ark. (1990); Taner ve Yanmaz (2003); Song ve ark. (2007) kullanmış ve embriyoların bitkiciklere dönüştüğünü rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla uyum içerisindedir. Çalışmamızda ayrıca ikincil somatik embriyogenesis de gözlenmiştir (Şekil 4.12). Başka araştırmacılar da benzer şekilde ikincil somatik embriyogenesisi gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Karpuzda Vinoth ve Ravindhran (2016), alevçiçeğinde (*Phlox paniculata* L.) Vejsadová ve ark. (2016), *Curcuma longa* L. ve *C.amada*'da (Sounder Raju ve ark. 2013), Soundar Raju ve ark. (2015), krizantemde Naing ve ark. (2013) tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

4.3.5. Somatik Embriyolardan Gelişen Bitkiciklerin (Embling) Kök Uzunlukları

Somatik embriyolar, IAA, kinetin ve kontrol grubu olan olgunlaştırma, çimlendirme ve geliştirme ortamlarında 3 ila 4 hafta süresince kültüre alınıp kök ve sürgün oluşturan embriyolar bitkiciklere dönüşmüştür. Bu bitkiciklerin aklimatizasyona alınma esnasında kök uzunlukları ölçülmüştür (Şekil 15).



Şekil 4.11. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkicikler (embling)

En yüksek ortalama kök uzunluğu 5.07 cm ile IAA (1 mg/l) ortamında gerçekleşirken bunu 5.04 cm ile kontrol ortamı ve 4.83 cm ile Kin (1 mg/l) içeren ortam takip etmiştir. Kök uzunlukları arasındaki farklar LSD (0.05) testine göre önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.8. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin (embling) kök uzunluğu

Ortalama kök boyu uzunluğu (cm)		
	BBD	
Kontrol	**IAA**	**Kin**
5.04 a	5.07 a	4.83 a
LSD 0.05	**1.2316**	

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir

4.3.6. Somatik Embriyolardan Gelişen Bitkiciklerin (Embling) Sürgün Boyları

Somatik embriyolar, IAA, kinetin ve kontrol grubu olan olgunlaştırma, çimlendirme ve geliştirme ortamlarında 3 ila 4 hafta süresince kültüre alınıp kök ve sürgün oluşturan embriyolar bitkiciklere dönüşmüştür. Bu bitkiciklerin aklimatizasyona alınma esnasında sürgün boyları ölçülmüştür (Şekil 4.14). Sürgün boyları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.9. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin (embling) sürgün boyları

BBD	Sürgün boyu ortalama değeri (cm)
Kontrol	6.02 a
IAA	5.75 a
Kin	5.85 a
LSD 0.05	**2.55**

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

4.3.7. Aklimatize Edilen SE Orjinli Bitkiciklerin (Embling) Sürgün Boyları

En yüksek ortalama sürgün boyu 7.07 ile IAA (1 mg/l) içeren ortamda meydana gelirken, bunu sırasıyla 6.71 cm ile Kin (1 mg/l) ve 5.63 cm ile kontrol ortamı izlemiştir. Sürgün boyları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.23). Dış ortam kaynaklı mantari hastalıklar, nem ve sıcaklık seviyesinin kontrol edilememesi gibi etmenler yüzünden bazı bitkiciklerin sürgünlerinde kuruma meydana gelerek sürgün boylarının kısalmasına ve bazıları ise tamamen kurumuştur.

Çizelge 4.10. Somatik embriyolardan gelişen bitkiciklerin aklimatizasyon sürecindeki sürgün boyları

Sürgün boyu ortalama değeri (cm)		
BBD		
Kontrol	**IAA**	**Kin**
5.63 b	7.07 a	6.71 a
LSD 0.05	**0.99**	

Harf farklılığı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.12. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) aklimatizasyonun 4.haftasındaki gelişimleri

Bu analizde hayatta kalan bitkiciklerin verilerinin ortalaması alınarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Bu nedenle BBD'nin bitkiciklerin sürgün boyları üzerindeki etkisi tam olarak yansıtılamamış olabilir.

4.3.8. Tarlaya Aktarılan Bitkicikler (Embling)

Aklimatizasyon sürecini tamamlayan bitkicikler (Şekil 4.16), yaklaşık 12 hafta sonra gelişmelerini sürdürebilmeleri için tarla şartlarına aktarılıp dikimleri gerçekleştirilimiştir (şekil 4.17). Ancak, giderilmesi imkan dahilinde olmayan dış ortam kaynaklı, nem ve sıcaklık seviyesinin kontrol edilememesi, mantari hastalıkların bulaşmasının önlenememesi ve aklimatizasyon sürecinin yaz aylarına kayması gibi etmenler yüzünden bitkiciklerde büyük kayıplara neden olmuştur. Bu sebepten dolayı çok az bitkicik hayatta kalabilmiştir. Somatik embriyolardan 94 adet bitkicik rejenere edilmiştir. Bu bitkiciklerin tümü aklimatizasyon işlemine alınmış ancak tarlaya sadece 7 adet aktarılabilmiştir. Bundan dolayı, bu konuda istatistiki analizler uygulamak için yeterli veri elde edilememiştir.



Şekil 4.13. Somatik embriyolardan geliştirilen bitkiciklerin (embling) aklimatizasyon sürecini tamamladıktan sonra araziye transfer edilip dikilmesi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Diyarbakır karpuzu Sürme tipinde somatik embriyogenesis gerçekleştirilmiştir. Sürme'nin 1 yıllık olgun tohumları %70'lik etanolde 60 sn çalkalanıp daha sonra steril distile su ile 3 kez çalkalanarak %5 NaOCl + 1 ila 2 ml Tween-20 çözeltisinde 5 dk karıştırılmış ardından da 5 kez 5 dk boyunca steril distile su ile çalkalanıp durulanmasıyla steril tohumlar elde edilebildiği gözlenmiştir. Çalışma boyunca, eksplantların elde edildiği fideler bu sterilizasyon protokolü uygulanmış tohumların çimlendirilmesi ile elde edilmiş olup tohum kaynaklı herhangi bir kontaminasyon tespit edilmemiştir.

Diyarbakır karpuzu Sürme tipinde somatik embriyogenesis için Deney I ve Deney II olmak üzere iki deney yapılmıştır. Kallus oluşumu açısından bakıldığında, her iki deneyde de yüksek oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Deney I'de MS besi ortamındaki tüm TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l) ve NAA (0.5, 1.0, 1.5 mg/l) konsantrasyon ve kombinasyonlarında %100 kallus oluşumu gerçekleşirken, TDZ + 2,4-D (0.5, 0.75, 1.0 mg/l) kombinasyonlarında kallus oluşumu gözlenmemiştir. Bu çalışmada 20-günlük kotiledon kesitleri için en iyi BBD kombinasyonu TDZ + NAA olmuştur. 20-günlük kotiledon kesitleri için oksin tipi olarak NAA'nın çok etkili olduğu ve 2,4-D'nin de kısıtlayıcı bir etki gösterdiği gözlenmiştir. NAA'nın 0.5, 1.0, 1.5 mg/l (sırasıyla %43.8, %37.5, %25) konsantrasyonları hariç, TDZ + NAA ortamlarında meydana gelen tüm kalluslar %100 oranında farklılaşarak embriyogenik özellik göstermiştir. Bu embriyogenik kalluslardan embriyo tespit edilmemiş ancak oldukça büyük miktarlarda kallus oluşumunun görülmesi dikkat çekicidir. Her bir eksplanttan oluşan kallus ağırlıklarının ortalamaları 820.1 - 4184.25 mg arasında olup en yükseği 4184.25 mg ile 0.25 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA içeren ortamda 1.altkültüre kadar sürdürülüp ardından 1 mg/l BAP içeren MS ortamında gözlenmiştir. Bu bulgular, Sürme'nin 20-günlük kotiledon kesitlerinin embriyogenik kallus oluşturma potansiyelinin çok yüksek olması somatik embriyogenesis kapasitesinin de yüksek olduğuna işaret etmektedir.

Deney II'de MS besi ortamındaki BAP + NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında %89 ila %100, BAP ve 2,4-D konsantrasyon ve kombinasyonlarında 1 nolu ortam (%61.27) hariç geriye kalan tüm ortamlarda %88.94 ila %100 arasında bir oranla kallus oluşumu gerçekleşmiştir. BAP + NAA ortamlarında eksplant tiplerinde

kallus oluşum oranları sırasıyla; kotiledon %97.44, hipokotil %97.12, kotiledon çeneği %96.36 olurken, BAP + 2,4-D ortamlarında, sırasıyla; kotiledon %98.76, hipokotil %94.36, kotiledon çeneği %96.41 olmuştur. NAA (0.5, 1.0, 1.5 mg/l) ve 2,4-D (0.5, 0.75, 1.0 mg/l) ile sitokinin olarak BAP (1.0, 2.0, 3.0) yerine TDZ (0.1, 0.25, 0.5 mg/l) kullanıldığında kallus oluşum oranlarında çok yüksek oranda farklılık gözlenmiştir. TDZ + NAA konsantrasyon ve kombinasyonlarında en yüksek kallus oluşum oranı %0-18.63, TDZ + 2,4-D için ise %0-50 arasında gözlenmiştir.

Çalışmamızda, 5-günlük kotiledon, hipokotil ve kotiledon çeneği eksplantların kallus oluşumu için en iyi sitokinin tipi BAP olurken, oksin tipleri olan NAA ve 2,4-D'nin her ikisinin de neredeyse aynı oranlarda etkili olduğu gözlenmiştir. Embriyogenik kallus açısından BBD değerlendirildiğinde, BAP ve NAA birlikte kullanıldığında embriyogenik kallus oluşum oranı %75-100, BAP ve 2,4-D birlikte kullanıldığında ise %0.62-86.21 arasında olmuştur. Embriyogenik kallus oluşturma açısından en iyi oksin ve sitokinin kombinasyonlarının BAP + NAA olduğu gözlenmiştir. BAP + NAA ve BAP + 2,4-D gruplarında en yüksek embriyogenik kallus oluşturan eksplant tipi %63.23 ile kotiledon olurken, onu %38.52 ile kotiledon çeneği ve % 18.35 ile hipokotil izlemiştir.

Embriyogenik kalluslardan elde edilen en çok somatik embriyo sayısı BAP + NAA kombinasyonlarından elde edilmiştir. En fazla ortalama embriyo sayısı 23.2 adet ile 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS besi ortamından elde edilmiştir. Eksplant tipi bazında ise en yüksek ortalama embriyo sayısı 62.6 adet ile 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren ortamdaki kotiledon eksplantı olurken, onu 46.9 adet ile kotiledon çeneği (1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA) ve 11.3 adet ile hipokotil (2mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) izlemiştir.

Somatik embriyolar, ortalama en yüksek %52.7 oranı ile 1 mg/l IAA, %35.5 ile kontrol ve %31.8 ile 1 mg/l Kinetin içeren MS olgunlaştırma ve çimlendirme ortamında çimlendiği gözlenmiştir. Aynı ortamlarda gelişimleri sürdürülen embriyoların kök ve sürgün oluşturup bitkiciklere dönüşme oranı sırasıyla en yüksekten; kontrol (%95.5), 1 mg/l IAA (%80.2) ve 1mg/l Kin (%77.3) olarak gözlenmiştir. Bu bitkiciklerin de sırasıyla en yüksekten; 1 mg/l Kin (%96.2), kontrol (%88.7) ve 1mg/l IAA (%76.9) oranında aklimatizasyona alınmıştır. Ancak, giderilmesi imkan dahilinde olmayan dış ortam kaynaklı, nem ve sıcaklık seviyesinin kontrol edilememesi, mantari hastalıkların bulaşmasının önlenememesi ve aklimatizasyon sürecinin yaz aylarına kayması gibi

etmenler yüzünden bitkiciklerde büyük kayıplara neden olmuştur. Bu sebepten dolayı çok az bitkicik hayatta kalabilmiştir. Yaklaşık 12 haftanın sonunda hayatta kalan bitkicikler arazi şartlarına aktarılıp dikimi gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca çalışmada, ender bir şekilde görülen sekonder somatik embriyogenesis de gözlenmiştir. Sekonder somatik embriyogenesisin görülmesi, genotipin yüksek somatik embriyogenesis kapasitesinin belirtisi olduğunu Vejsadová ve ark. (2016), birincil somatik embriyogenesise göre daha yüksek çoğaltım oranı ve yüksek üniformluk seviyesi gibi avantajlar sağladığını Naing ve ark. (2013) bildirmişlerdir.

Genel olarak değerlendirildiğinde Diyarbakır karpuzu Sürme tipinde, hem kallus hem de embriyogenik kallus indüksiyonuna çok yüksek oranlarda yanıt vermesi ve elde edilen somatik embriyolardan başarılı bir şekilde bitkicikler rejenere edilmesi yanısıra sekonder somatik embriyogenesis ve dahası organogenesisin de gözlemlenmesi, hem rejenerasyon hem de somatik embriyogenesis kapasitesinin çok yüksek olduğunun göstergesi olmuştur. Bu sebeple, bu çalışmada geliştirilen rejenerasyon protokolü ve elde edilen bulgular ışığında Diyarbakır karpuzu Sürme tipi için sekonder somatik embriyogenesis ve organogenesis protokollerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

5-günlük eksplantlardan somatik embriyogenesis yoluyla embriyolar başarılı bir şekilde elde edilirken, 20-günlük eksplantlarda embriyo oluşumu tespit edilememiştir. Ancak, 20-günlük eksplantların çok yüksek miktarlarda kallus oluşturup en az 12 hafta boyunca gelişimlerini sürdürebilmiş olmaları yüksek rejenerasyon ve somatik embriyogenesis potansiyelinin varlığına işaret ettiği düşünülmektedir. 20-günlük eksplantlardan elde edilen yüksek miktarlardaki embriyogenik kalluslardan embriyo elde etmek için farklı BBD konsantrasyon ve kombinasyonları, besi ortamı veya kimyasalların denenmesi yanısıra süspansiyon kültürü önerilebilir.

Somatik embriyogenesis yoluyla 5-günlük eksplantlardan rejenere edilen embriyoların yüksek oranlarda olgunlaştırılıp çimlendirilebilmesi için embriyo olgunlaştırma ve çimlendirme ortamlarının geliştirilmesi amacıyla oksin ve sitokinin tiplerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile besi ortamlarının denenmesi önerilmektedir.

Somatik embriyolardan elde edilen bitkicikler (embling) gözlemlendiği kadarıyla, çok hassas olabilmekteler dolayısıyla aklimatizasyon süreci çok kritik olabilmektedir. Bu

sebeple başarılı bir aklimatizasyon süreci için ışık, sıcaklık ve nem kontrolü yapılabilen elverişli bir aklimatizasyon odası veya iklim dolabının kullanılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, Sürme'nin somatik embriyogenesis yoluyla çoğaltılabildiği saptanmış olmakla birlikte rejenerasyon ve somatik embriyogesis potansiyelinin de yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, elde edilen somatik embriyolar kapsüllenerek (encapsulation) sentetik tohumlara dönüştürülebilir. Bu çalışmada geliştirilen somatik embriyogenesis protokülü ve elde edilen bulguların Diyarbakır karpuzu Sürme tipinde ve diğer yerel genotiplerde yapılacak sentetik tohum çalışmaları, süspansiyon kültürü, hücre kültürü ve *Agribacterium tumefaciens* ile gen aktarım çalışmaları için son derece önemli olup temel teşkil edecek niteliktedir. Sürme için geliştirilen bu protokol optimize edilerek nesli tükenme riskiyle karşı karşıya kalan ekonomik ve ıslah materyali olması açısından önemli olan Diyarbakır karpuzu Sürme tipi ve diğer genotiplerin, moleküler düzeyde ıslahı, klonal çoğaltımı, sentetik tohum üretimi ve büyük ölçeklerde hızlı *in vitro* üretiminin gerçekleştirilmesinde kullanılabilecektir.

6. KAYNAKLAR

Ahmet Onay , Hakan Yıldırım , Vedat Pirinç , Engin Tilkat , Yelda Özden Çiftçi, H. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. Batman Üniversitesi Uluslararası Katılımlı Bilim ve Kültür Sempozyumu, 18-20 Nisan 2012 içinde (C. 1, ss. 11–28). Batman: ***Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi***.

Altman, A. ve Hasegawa, P. M. 2012. Plant Biotechnology And Agriculture: Prospects For The 21st Century. Academic Press. s.577.

Ameri, M., Lahouti, M., Bagheri, A., Sharifi, A. ve Keykha Akhar, F. 2015. In vitro regeneration of watermelon seed segments. ***Journal of Biology and Today's World***, *4*(8), 173–179.

Ameri, Maryam, Lahouti, M., Bagheri, A., Sharifi, A. ve Keykha, F. 2016. Indirect regeneration from cotyledonary explants of watermelon (Citrullus lanatus) at in vitro culture. ***International Journal of Advanced Research***, *4*(11), 1451–1458.

Anonim. 2020. World population. [https://www.census.gov/popclock] adresinden erişildi. Erişim Tarihi: 04.07.2020.

Balen, B., Leljak-Levanić, D., Mihaljević, S., Jelenić, S. ve Jelaska, S. 2004. Formation of embryogenic callus in hairy roots of pumpkin (Cucurbita pepo L.). ***In Vitro Cellular and Developmental Biology*** - *Plant*, *40*(2), 182–187.

Barnes, L. R. 1979. In vitro propagation of watermelon. ***Scientia Horticulturae***, 11(3), 223–227.

Bhatia, S., Sharma, K., Randhir, D. ve Bera, T. 2015. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, 210-219 .

Bonner, J. 1965. Development in Plant Biochemistry. (J. E. Bonner, J.; Varner, Ed.). New York: Academic Press.

Cade, R. M., Wehner, T. C. ve Blazich, F. A. 1990. Somatic Embryos Derived from Cotyledons of Cucumber. ***Journal of the American Society for Horticultural Science***, 115(4), 691–696.

Chaturvedi, R. ve Bhatnagar, S. P. 2001. High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar baby. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, *37*(2), 255–258.

Chee, P. P. 1995. Somatic Embryogenesis in Cucurbits. In Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II ,(ss. 138–150).Springer, Berlin, Heidelberg. 31,138-150.

Chee, Paula P. 1991. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Squash Cucurbita pepo L cv. YC 60. ***Plant Cell Reports***, 620–622.

Choi, P. S., Soh, W. Y., Kim, Y. S., Yoo, O. J. ve Liu, J. R. 1994. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using Agrobacterium tumefaciens. ***Plant Cell Reports***, *13*(6), 344–348.

Cihad, F. ve Solmaz, I. 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.

Compton, M. E., Gray, D. J. ve Elmstrom, G. W. 1996. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured in vitro. ***Euphytica***, *87*(3), 165–172.

Compton, Michael E. 1999. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *58*(3), 185–188.

Compton, Michael E. ve Gray, D. J. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of Watermelon. ***Plant Cell and Tissue Culture***, *12*, 61–65.

Debeaujon, I. ve Branchard, M. 1993. Somatic embryogenesis in Cucurbitaceae. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *34*(1), 91–100.

Decoteau, D. D. 2000. Vegetable Crops. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Demir, İ. 1974. Bitki Islahı. Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi.

El-Sayed el-absawy, Khidr, Y. A., Mahmoud, A., Hasan, M. E. ve Hemeida, A. A. 2012. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration Induced From Mature Seeds, Cotyledons and Shoot Tips of Cucumber. ***Journal of Productivity and Development***, *17*(2), 193–209.

Esquinas-Alcazar, J. T. ve Gulick, P. J. 1983. International Board for Plant Genetic Resources, Genetic Resources of Cucurbitaceae. Rome: IBPGR Secreteriat.

FAO. 2017. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. [www.fao.org/publications] adresinden erişildi. Erişim Tarihi: 01.06.2020

FAO. 2020. Production. 7 Temmuz 2020 tarihinde [http://www.fao.org/statistics/en/] adresinden erişildi.

Ganasan, K. ve Huyop, F. 2010. In vitro regeneration of Citrullus lanatus cv. round dragon. ***Journal of Biological Sciences***.

Gonsalves, C., Xue Baodi ve Gonsalves, D. 1995. Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants of six squash cultivars. ***HortScience***, *30*(6), 1295–1297.

Gray, D. J., McColley, D. W. ve Compton, M. E. 1993. High-frequency Somatic Embryogenesis from Quiescent Seed Cotyledons of Cucumis melo Cultivars. ***Journal of the American Society for Horticultural Science***, *118*(3), 425–432.

Halperin, W. 1995. In Vitro Embryogenesis: Some Historical Issues and Unresolved Problems. T. A. Thorpe (Ed.), Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture içinde, ss. 1–16.

Hongyan, H., Lianguo, L., Yuchen, J. ve Qingmei, Z. 2005. 韩红岩 **李**连国 贾宇臣 张清梅 Studies of Somatic Embryo via Cotyledon Induction in Cucumis melo L. ***Acta Horticulturae sinica***.

Huang, Y. H., Lu, L., Tao, X. L. ve Zhao, C. Z. 2006. Establishment of Plant Regeneration System for Cucumis melo cv. GT-1. ***Journal of Fruit Science***, *23*(5), 740–744.

Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. ***Botanical Journal of the Linnean Society***, *81*, 233–247.

Jelaska, S. 1972. Short Communication Embryoid Formation by Fragments of

Cotyledons and Hypoeotyls in Cucurbita pepo. ***Planta (Berl.)***, *103*, 278–280.

Jelaska, S. 1974. Embryogenesis and Organogenesis in Pumpkin Explants. ***Physiologia Plantarum***, *31*(4), 257–261.

Jelaska, S., Magnus, V., Seretin, M. ve Laćan, G. 1985. Induction of embryogenic callus in Cucurbita pepo hypocotyl explants by indole-3-ethanol and its sugar conjugates. ***Physiologia Plantarum***, *64*(2), 237–242.

Khalekuzzaman, M., Khatun, M., Rashid, M. H., Sheikh, M. I., Sharmin, S. A. ve Alam, I. 2012. Micropropagation of an elite F1 watermelon (Citrullus lanatus) hybrid from the shoot tip of field grown plants. ***Brazilian Archives of Biology and Technology,*** *55*(3), 335–340.

Khatun, M. M., Hossain, M. S., Khalekuzzaman, M., Rownaq, A. ve Rahman, M. 2010. In vitro plant regeneration from cotyledon and internodes derived callus in watermelon (Citrulus lanatus Thumb.). ***International Journal Sustain Crop Prod.***, *5*(4), 25–29.

Krug, M. G. Z., Stipp, L. C. L., Rodriguez, A. P. M. ve Mendes, B. M. J. 2005. In vitro organogenesis in watermelon cotyledons. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, *40*(9), 861–865.

Kumar, P. P. ve Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. P. M. H. Arie Altman (Ed.), Plant Biotechnology and Agriculture içinde (First Edit., ss. 131–138). Academic Press.

Kwack, S. N. ve Fujieda, K. 1988. Somatic Embryogenesis in Cultured Unfertilized Ovules of Cucurbita moschata. ***Journal of the Japanese Society for Horticultural Science***, *57*(1), 34–42.

Li Zhang, Jia Lai, Yi Tang, Qian Luo, Yongpeng Zhu ve Huanxiu Li. 2013. A Review of Somatic Embryogenesis in Cucurbitaceae. ***Journal of Agricultural Science and Technology*** *B*, *3*(1), 1–9.

Lou, H. ve Kako, S. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Cucumber. ***HortScience***, *29*(8), 906–909.

Loyola-Vargas, V. M. ve Vázquez-Flota, F. 2006. Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols (2nd bs.). New Jersey.

Murashige, T. ve Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. ***Physiologia Plantarum***, *15*, 474–497.

Naderi, D., Mousavi, A., Habashi, A. A. ve Lotfi, M. 2011. Optimization of somatic embryogenesis induction in Iranian melon (Cucumis melo cv. Khatooni). ***African Journal of Biotechnology***, *10*(34), 6434–6438.

Naing, A. H., Kim, C. K., Yun, B. J., Jin, J. Y. ve Lim, K. B. 2013. Primary and secondary somatic embryogenesis in Chrysanthemum cv. Euro. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *112*(3), 361–368.

Niu, S., Song, S., Yang, F. ve Miao, H. xia. 2006. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Citrullus lanatus cv. Zhengkang no. 4. ***Journal of Fruit Science***, *23*(3), 406–410.

Okumuş, V., Pirinç, V., Onay, A. ve Başaran, D. 2011. Diyarbakır karpuzunun in vitro çoğaltılması ve doğrudan tohumdan ve aktarılmış fidelerden elde edilen karpuzların

karşılaştırılması. ***Turkish Journal of Biology***, *35*(5), 601–610.

Oridate, T., Atsumi, H., Ito, S. ve Araki, H. 1992. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (Cucumis melo L.). ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *29*(1), 27–30.

Oridate, T. ve Oosawa, K. 1986. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Callus Culture in Melon (Cucumis melo L.). ***Japan J. Breed***, *36*, 424–428.

Perkins-Veazie, P. 2010. Cucurbits, watermelon, and benefits to human health. ***Acta Horticulturae*** içinde (C. 871, ss. 25–32).

Pirinç, V. 2004. Diyarbakır Karpuzunun (citrullus lanatus cv. "Sürme") mikroçoğaltılması.Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 141.

Pirinç, V., Onay, A., Yıldırım, H., Adıyaman, F., Işıkalan, Ç. ve Başaran, D. 2003. Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid Diyarbakır Watermelon (Citrullus lanatus cv. "Sürme"). ***Turkish Journal of Biology***, *27*(2), 101–105.

Punja, Z. K., Abbas, N., Sarmento, G. G. ve Tang, F. A. 1990. Regeneration of Cucumis sativus var. sativus and C.sativus var. hardwickii, C.melo, and C.metuliferus from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *21*, 93–102.

Raji, M. R., Lotfi, M., Tohidfar, M., Zahedi, B., Carra, A., Abbate, L. ve Carimi, F. 2018. Somatic embryogenesis of muskmelon (Cucumis melo L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers. ***Protoplasma***, *255*(3), 873–883.

Ramakrishna, D. ve Shasthree, T. 2016. High efficient somatic embryogenesis development from leaf cultures of Citrullus colocynthis (L.) Schrad for generating true type clones. ***Physiology and Molecular Biology of Plants***, *22*(2), 279–285.

Rose, R. J. ve Song, Y. 2017. Somatic Embryogenesis. Encyclopedia of Applied Plant Sciences içinde (2nd bs.), C. 2, ss. 474–479.

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116 (9.baskı.). İzmir: Ege Üniversitesi.

Shalaby, T. A., Omran, S. A. ve Baioumi, Y. A. 2008. In vitro propagation of two triploid hybrids of watermelon through adventitious shoot organogenesis and shoot tip culture, ***Acta Biologica Szegediensis,*** 52(1), 27–31.

Shasthree, T., Ramakrishna, D., Imran, M. A. ve Chandrashekar, C. 2014. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from leaf and cotyledon explants of citrullus colocynthis. ***Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants***, *20*(3), 235–244.

Siddiqui, W. A., Shahzad, M., Shabbir, A. ve Ahmad, A. 2018. Evaluation of anti-urolithiatic and diuretic activities of watermelon (Citrullus lanatus) using in vivo and in vitro experiments. ***Biomedicine and Pharmacotherapy***, *97*(October 2017), 1212–1221.

Song, S., Yan, F., Niu, S. ve Miao, H. xia. 2007. Study on Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Cotyledon of Seedless Watermelon. ***Journal of Henan***

Agricultural University, *41*(3).

Soundar Raju, C., Aslam, A. ve Shajahan, A. 2015. High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of turmeric (Curcuma longa L.). ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *122*(1), 79–87.

Sultana, R. S., Bari, M. A., Rahman, M. H., Rahman, M. M., Siddique, N. A. ve Khatun, N. 2004. In vitro Rapid Regeneration of Plantlets from Leaf Explant of Watermelon (Citrullus lanatus Thumb.). ***Biotechnology(Faisalabad)***. Asian Network for Scientific Information.

Suratman, F., Huyop, F. ve Parveez, G. K. A. 2009. In vitro shoot regeneration of citrullus vulgaris schrad (Watermelon). ***Biotechnology***.

Tabei, Y., Yamanaka, H. ve Kanno, T. 1993. Adventitious Shoot Induction and Plant Regeneration from Cotyledons of Mature Seed in Watermelon (Citrullus lanatus L.). ***Plant tissue culture letters***.

Taner, K. Y. ve Yanmaz, R. 2003. Kavunda (Cucumis melo L.) Somatik Embriyogenesis Yoluyla Bitki Eldesi. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü içinde . Antalya: Hasad Yayıncılık LTD.ŞTİ.

Thiruvengadam, M., Jeyakumar, J. J., Kamaraj, M., Lee, Y. J. ve Chung, I. M. 2013. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of gherkin (Cucumis anguria L.). ***Australian Journal of Crop Science***, *7*(7), 969–977.

Trulson, A. J. ve Shahin, E. A. 1986. In vitro plant regeneration in the genus cucumis. ***Plant Science***, *47*, 35–43.

TUİK. 2020. Bitkisel üretim istatistikleri. 7 Temmuz 2020 tarihinde [https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2020-33737] adresinden erişildi.

Urbanek, A., Zechmann, B. ve Müller, M. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: Cytological and biochemical investigations. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, *79*(3), 329–340.

Usman, M., Hussain, Z. ve Fatima, B. 2011. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves. ***Pakistan Journal of Botany***, *43*(2), 1283–1293.

Vejsadová, H., Matiska, P., Obert, B., Ürgeová, E. ve Pretová, A. 2016. Somatic embryogenesis in Phlox paniculata-histological analysis. ***Biologia (Poland)***, *71*(7), 763–768.

Vinoth, A. ve Ravindhran, R. 2016. Efficient plant regeneration of watermelon (Citrullus lanatus Thunb.) via somatic embryogenesis and assessment of genetic fidelity using ISSR markers. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant,*** *52*(1), 107–115.

Yongjiong, J., Tianlun, J., Maoguo, G., Chengxin, L. ve Xiaoli, H. 1991. Callus Induction and Plantlet Regeneration from Hypocotyls of Triploid Watermelon. ***Journal of Sichuan University Natural Science*** *Edition*, *28*(1), 94–97.

Zarka, V., Velich, I. ve Bisztray, G. 2000. In vitro regeneration from cotyledons of watermelon. ***International Journal of Horticultural Science***, *6*(4), 9698.

Zhang, L., Lai, J., Tang, Y., Ma, J. ve Li, H. 2014. Improved Induction of Somatic

Embryo in Watermelon [Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. et Nakai]. ***Journal of Agricultural Science***, *6*(2), 81–89.