

15067H

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
EN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYARBAKIR KARPUZUNUN (*Citrullus lanatus* cv. "Sürme")  
MİKROÇOĞALTILMASI**

Vedat PİRİNÇ

(DOKTORA TEZİ)  
Biyoloji Anabilim Dalı

150671

DİYARBAKIR - 2004

T.C





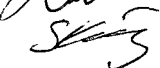
DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

**Jüri Üyesinin**

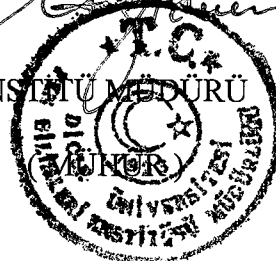
<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
<b>Başkan:</b> Prof. Dr.	Davut BAŞARAN	
<b>Üye :</b> Prof. Dr.	Hasan Çetin ÖZEN	
<b>Üye :</b> Doç. Dr.	Ahmet ONAY (Danışman)	
<b>Üye :</b> Yrd. Doç. Dr.	Hatice BUDAK	
<b>Üye :</b> Yrd. Doç. Dr.	Sevda KIRBAĞ	

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

23.07.2004

Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



## TEŞEKKÜR

Benim için her türlü cefa ve fedakarlığa katlanarak, bugünlere gelmemde haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim ve her zaman olduğu gibi doktora tez çalışmasında da beni yalnız bırakmayarak verdikleri duygusal dopingleriyle destek olan değerli aileme ve özellikle de ablama sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tez çalışmamın yürütülebilmesi için Biyoteknoloji Laboratuvarı'nı ve olanaklarını araştırmanın hizmetine sunan ve çalışma süresince, engin deneyimini, hoşgörüsünü ve şefkatini esirgemeyen fahri danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Korumakta yetersiz kaldığımız ve kaybolma tehlikesi içinde olan Diyarbakır karpuzunun ıslahıyla ilgili bu araştırma konusunu bana veren, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen, performansına ulaşmakta zorlandığım, bilimsel ufku ve teşvik edici tavırlarıyla akademik çalışmalarına ivme kazandıran danışman hocam; Sayın Doç. Dr. Ahmet ONAY'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlarından dolayı; Arş. Gör. Dr. Çiğdem IŞIKALAN, Arş. Gör. Dr. Filiz ADIYAMAN'a, ve Engin TILKAT'a, ayrıca, değerli hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e ve Biyoloji Bölümünün tüm elemanlarına; gösterdikleri misafirperverliklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Doktora tez çalışmam süresince, her türlü yardımlarını ve desteklerini gördüğüm, değerli bölüm arkadaşlarım ve dostlarım; Arş. Gör. Hakan YILDIRIM ve Arş. Gör. Zafer AKTÜRK'e; literatürlerinden yararlandığım hocam, Prof. Dr. Nebahat SARI'ya ve öğrencim Halil AZİZOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu alışma, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Proje Koordinatörlüğü tarafından,  
DAPK 02-FF-36 numaralı proje ile desteklenmiştir.





<b>İÇİNDEKİLER</b>		<b>Sayfa</b>
<b>1.</b>	<b>GİRİŞ</b>	1
<b>2.</b>	<b>ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b>	6
2.1.	Karpuz Hakkında Genel Bilgiler	6
2.1.1.	Orijini ve Tarihçesi	6
2.1.2.	Biyolojisi	8
2.1.2.1.	Erkek Çiçek	8
2.1.2.2.	Dişi Çiçek	8
2.1.3.	Önemi	9
2.1.4.	Diyarbakır Karpuzu Yetiştiriciliği	13
2.1.4.1.	Sıra (çizgi) Usulü	14
2.1.4.2.	Ocak Usulü	14
2.1.4.3.	Kuyu Karpuzculuğu	14
2.1.5.	Tez Konusunun Orijinalliği, Getireceği Yenilikler ve Sonuçlar	16
2.2.	<i>In Vitro</i> Karpuz Rejenerasyon Çalışmaları	16
2.2.1.	Sürgün Ucu Mikroçoğaltımı	17
2.2.2.	Adventif Sürgün Organojenezisi	19
2.2.3.	Somatik Embriyogenesis	25
2.2.4.	Hastalıklara Dayanıklılığın Geliştirilmesinde Doku Kültürü ve Biyoteknolojik Uygulamalar	26
2.2.4.1.	Genetik Transformasyon	26
2.2.4.2.	Hastalığa Dayanıklı Bitkilerin Elde Edilmesinde Somaklonal Varyasyonun Kullanımı	29
2.2.5.	Çekirdeksiz Karpuz Islahında Somaklonal Varyantların Kullanılması	30
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	39
3.1.	Materyal	39

3.1.1.	Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri	39
3.1.1.1.	Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Eksplant Tipleri	40
3.2.	Yöntem	41
3.2.1.	Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması	41
3.2.1.1.	Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	41
3.2.1.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	44
3.2.1.3.	Sterilizasyon Teknikleri	44
3.2.1.4.	Isı ile Sterilizasyon	45
3.2.1.5.	Filtrasyon ile Sterilizasyon	45
3.2.1.6.	Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	45
3.2.1.7.	Cam Malzemelerin Sterilizasyonu	45
3.2.1.8.	Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu	46
3.2.1.9.	Röpikaj Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	46
3.2.1.10.	Kültür Şartları (Büyüme Odası)	46
3.2.1.11.	Değerlendirme	47
3.2.2.	Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları	47
3.2.2.1.	Olgun Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	48
3.2.2.1.1.	Kabukları Çatlatılmamış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	48
3.2.2.1.2.	Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	48
3.2.2.1.3.	Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna %3'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi	49
3.2.2.1.4.	Taze Tohumların Sterilizasyonu	49
3.2.2.2.	Serada Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	50
3.2.2.2.1.	Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	50
3.2.2.2.2.	Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi	50
3.2.2.3.	<i>In Vivo</i> 'da Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	50

3.2.3.	Kültür Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları	51
3.2.3.1.	Farklı Besi Ortamlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	51
3.2.3.2.	MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	52
3.2.3.3.	pH'nın Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	52
3.2.3.4.	Agar Konsantrasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	52
3.2.3.5.	Şeker Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	52
3.2.3.6.	Sakkarozun Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	53
3.2.3.7.	Eksplant Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	53
3.2.3.8.	Eksplant Büyüklüğünün Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	53
3.2.3.9.	Işık Yoğunluğunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	53
3.2.4.	Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları	54
3.2.4.1.	Sitokinin Tipi ve Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	54
3.2.4.1.1.	BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	54
3.2.4.1.2.	Kinetinin Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	54
3.2.4.2.	BA'ya Oksin İlavesinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	55
3.2.4.3.	Eksplant Yaşının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	55
3.2.4.4.	Altkültür Sayısının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	55
3.2.4.5.	Kültürde Bekletme Süresinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	55
3.2.5.	Rejenerantları Köklendirme Çalışmaları	55
3.2.5.1.	Oksinlerin Köklenmeye Etkileri	56
3.2.5.1.1.	IAA'nın Köklenmeye Etkisi	56
3.2.5.1.2.	IBA'nın Köklenmeye Etkisi	56
3.2.5.1.3.	NAA'nın Köklenmeye Etkisi	57
3.2.5.2.	Altkültür Sayısının Köklenmeye Etkisi	57
3.2.5.3.	Eksplant Tipinin Köklenmeye Etkisi.	57
3.2.5.4.	Karanlık İşleminin Köklenmeye Etkisi	57

3.2.6.	Aklimatizasyon	57
3.2.6.1.	Aklimatizasyonda Kullanılan Substratın Sterilizasyonu	58
3.2.7.	Tetraploid Oluşturulması	58
3.2.7.1.	Tarlada Kolşisin Uygulaması	59
3.2.7.2.	Tohuma Kolşisin Uygulaması	59
3.2.8.	Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi	59
3.2.8.1.	Bekçi Hücredeki Kloroplast Sayımı	59
3.2.8.2.	<i>In Vitro</i> Rejenerantlarda, Tohumdan Yetiştirilen Bitkilerde, Kolşisin Uygulanan Tohum ve Bitkilere Ait Yapraklarda Ploidinin Belirlenmesi	60
3.3.	Verilerin Değerlendirilmesi	60
<b>4.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>62</b>
4.1.	Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları	62
4.1.1.	Olgun Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	62
4.1.1.1.	Kabukları Çatlatılmamış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	62
4.1.1.2.	Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	63
4.1.1.3.	Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna %3'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi	64
4.1.1.4.	Taze Tohumların Sterilizasyonu	65
4.1.2.	Serada Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	67
4.1.2.1.	Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	67
4.1.2.2.	Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi	68
4.1.3.	<i>In Vivo</i> 'da Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	69
4.1.4.	Tohum ve Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Değerlendirme	70
4.2.	Kültür Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları	72
4.2.1.	Farklı Besi Ortamlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	72
4.2.2.	MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	72

4.2.3.	pH'nın Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	74
4.2.4.	Agar Konsantrasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	75
4.2.5.	Şeker Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	75
4.2.6.	Sakkarozun Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	76
4.2.7.	Eksplant Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	78
4.2.8.	Eksplant Büyüklüğünün Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	79
4.2.9.	Işık Yoğunluğunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	80
4.2.10.	Kültür Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Değerlendirme	81
4.3.	Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları	83
4.3.1.	Sitokin Tipi ve Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	83
4.3.1.1.	BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	83
4.3.1.2.	Kinetinin Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	84
4.3.2.	BA'ya Oksin İlavesinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	86
4.3.3.	Eksplant Yaşının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	87
4.3.4.	Altkültür Sayısının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	88
4.3.5.	Kültürde Bekletme Süresinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi	89
4.3.6.	Sürgün Proliferasyonu ile İlgili Değerlendirme	91
4.4.	Rejenerantları Köklendirme Çalışmaları	95
4.4.1.	Oksinlerin Köklenmeye Etkileri	95
4.4.1.1.	IAA'nın Köklenmeye Etkisi	95
4.4.1.2.	IBA'nın Köklenmeye Etkisi	96
4.4.1.3.	NAA'nın Köklenmeye Etkisi	98
4.4.2.	Altkültür Sayısının Köklenmeye Etkisi	99
4.4.3.	Eksplant Tipinin Köklenmeye Etkisi	101
4.4.4.	Karanlık İşleminin Köklenmeye Etkisi	102
4.4.5.	Rejenerantların Köklendirilmesi ile İlgili Değerlendirme	103
4.5.	Aklimatizasyon	106

4.5.1.	Aklimatizasyon ile İlgili Değerlendirme	109
4.6.	Tetraploid Oluşturulması	109
4.6.1.	Tarlada Kolşisin Uygulaması	110
4.6.2.	Tohuma Kolşisin Uygulaması	111
4.6.3.	Teraploid Oluşturulması ile İlgili Değerlendirme	112
4.7.	Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi	114
4.7.1.	Ploidi Seviyesi ile İlgili Değerlendirme	116
5.	<b>SONUÇ</b>	120
6.	<b>KAYNAKLAR</b>	124
7.	<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	137
8.	<b>RESİM LİSTESİ</b>	139
9.	<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	140
10.	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	141

## AMAÇ

Bölgemizde ve ülkemizde yoğun olarak tüketilen karpuz büyük bir üretim potansiyeline sahiptir. Bu üretimde kimi zaman yerel çeşitler, vazgeçilmez bir tarımsal ürün olarak önemli bir konuma sahip olabilmektedir. Diyarbakır ilinde yıllardan beri yetiştirilen, yöreyle özdeşleşmiş, tad ve lezzet açısından yöre insanının tüketim alışkanlığına uygun olan yerel Diyarbakır karpuz çeşitleri oldukça önemli tarımsal ürünler arasındadır. Kalite özelliklerinin yanı sıra, ıslah açısından da önemli bir gen kaynağı sayılabilecek konumdadır. Bu güne kadar ıslahına yönelik bir çalışmanın yapılmamış olması ve yöreye farklı hibrit karpuz çeşitlerinin hızla girmesiyle; bu değerli bitkisel ıslah materyali kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya bırakılmıştır. Beş çeşit (Sürme, Pembe, Kara Kış, Beyaz Kış ve Ferik Paşa) olarak bilinen Diyarbakır karpuzunun sadece "Sürme" çeşidinin günümüze kadar gelebilmesi bunun kanıtı olarak gösterilebilir.

Bu çalışmada, mevcut Diyarbakır karpuz çeşitlerinden yetiştiriciliği en yaygın ve yoğun olarak yapılan diploid "Sürme" çeşidinin ıslahına ve çoğaltımına yönelik olarak *in vitro* ticari bir mikroçoğaltım sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece yoğun üretimi yapılan "Sürme" çeşidinin üretim maliyeti azaltılarak, uniform, homojen, yüksek kalite ve verim değerine sahip ürün elde edilerek yöre çiftçisine ve ekonomiye katkı sağlanacaktır. Böylece, gelecekte Diyarbakır karpuzu üzerine yapılacak diğer doku kültürü çalışmaları için optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemi ve ıslah edilmiş Diyarbakır karpuz çeşitlerinin hızlı çoğaltımında kullanılacak bir yöntem tanımlanmış olacaktır.

Yukarıdaki amaçlara ulaşmak için bu çalışmanın objektiflerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

1. Başka karpuz çeşitleri üzerine tanımlanmış mevcut mikroçoğaltım yöntemleri göz önünde bulundurularak "Sürme" çeşidi için *in vitro* entegre bir çoğaltım yönteminin tanımlanması.
2. Diploid karpuz kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ile triploid hibritlerin ıslahında kullanmak için verimli tetraploidlerin oluşturulması ve çoğaltılması için çoğaltım yönteminin tanımlanması.
3. Elde edilen bitkilerin, ploidi düzeylerinin kloroplastlardaki bekçi hücre sayımıyla doğrulanması ile diploid ve tetraploidlerin belirlenmesidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

Diyarbakır Karpuzunun (*Citrullus lanatus* cv. Sürme) Mikroçoğaltılması

Vedat PİRİNÇ

Dicle Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

2004, Sayfa: 141

Bu çalışmada, Diyarbakır karpuz çeşitlerinden yetiştiriciliği en yaygın olan "Sürme" çeşidinin ıslahına ve çoğaltımına yönelik olarak *in vitro* mikroçoğaltım metodunun ve çekirdeksiz karpuz üretiminde kullanmak için tetraploid oluşum yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada tohumların yüzey sterilizasyonunda, %3 NaOCI'te 5 dakika uygulamasının etkili olduğu ve 5 günlük kotiledonların, en iyi eksplant olduğu bulunmuştur. *In vitro* çalışmalarda, 1/1 yoğunluktaki modifiye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) besi ortamı kullanılmış, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz en uygun şeker tipi ve konsantrasyonu, 7 g l<sup>-1</sup> agarın optimum agar konsantrasyonu ve 5.8'in de en uygun pH değeri olduğu bulunmuştur.

Sürgün veriminin artırılmasında 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA'nın etkin olduğu ve bu ortamda eksplant başına ortalama 8.46 adet sürgün ve 2.21 cm sürgün uzunluğu elde edilmiştir. 100 eksplantla kültüre başlanması halinde 6 ayda; 1 382 400 adet bitki üretilmesi mümkündür.

Rejenerantların köklenmesinde, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA'nın en uygun oksin tipi ve konsantrasyonu olurken maksimum köklenme oranı, 7 gün karanlıkta bırakılan kültürlerde %87 olarak bulunmuştur. Tüm altkültürlerde, sürgün verimi ve köklenme oranları beklenenden iyi çıkmıştır.

Tohumların %0.02 ve bitki büyüme uçlarının %0.2'lik kolşisin çözeltisiyle 24 saat muamele edilerek tetraploid oluşum gerçekleştirilmiştir. Ploidi seviyesi, bekçi hücredeki kloroplastların sayılmasıyla belirlenmiştir. Tohuma kolşisin uygulanarak oluşan bitki yapraklarında 16.95 ve bitki büyüme uçlarına uygulananlarda ise 19.47 kloroplast sayılarak



tetraploid oluşum tespit edilmiştir. Uygulama yapılmayan bitkilerde ise 10.70 kloroplast sayılarak Sürme'nin diploid olduğu belirlenmiştir.

“Sürme” için geliştirilen mikroçoğaltım sayesinde; benzer özellik gösteren çok sayıda fide tek tohum ya da tohumlardan elde edileceğinden ürünün verim ve kalitesini arttırarak üreticilerin gelirlerinin artışına neden olacak ve gelecekte yapılacak çalışmalara da referans olacaktır.



**ANAHTAR KELİMELELER:** karpuz, doku kültürü, mikroçoğaltım

**SUMMARY**

PhD. Thesis

Micropropagation of Diyarbakır Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. Sürme)

Vedat PİRİNÇ

Dicle University

Graduated School of Natural and Applied Science

Department of Biology

2004, Page: 141

The aim of this study was to develop an *in vitro* micropropagation methods used in breeding and propagation for diploid “Sürme” variety of Diyarbakır watermelon that has the highest growing potential in the region. Methods were also developed for tetraploid formation used in breeding and production of triploid watermelon in future.


An effective surface sterilisation of seed used as a main explant source was to soak in 3% commercial NaOCI solution for 5 minutes. Explants consisted of two cotyledons from 5-days-old seedlings were the best explant type. For all *in vitro* shoot proliferation studies, a modified Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> sucrose and 7 g l<sup>-1</sup> was the best medium. 5.8 degree was found the best pH degree of the medium.

BA of 0.5 mg l<sup>-1</sup> was the best cytokine type and concentration to propagate the most shoots. 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA gave 8.46 shoot/explant with 2.21 cm shoot length. 1 382 400 plants could be produced from initial culture beginning with 100 explants, during 6 months.

The best auxin type and concentration is NAA of 1 mg l<sup>-1</sup>, for rooting of regenerated shoots. The maximum rooting rate was 87% obtained from the cultures keeping in dark for 7 days. The yield of shoots and rooting rate is obtained better than expecting rate from all subculture numbers.

The tetraploid formation was occurred when the seed and the plant apical top treated with 0.02% and 0.2 % colchicines for 24 hours respectively. The ploidy level of plant was estimated by counting the numbers of chloroplast per guard cell pair at the lower epidermis. The mean number of chloroplast, for plant and the seed, treated with colchicine was 19.47 and 16.95 respectively. This finding was proof for tetraploid formation. The ploidy level of diploid “Sürme” variety was obtained by counting the chloroplast. Average 10.70 chloroplast was counted from this variety.

Using the micropropagation protocol developed for Diyarbakır watermelon “Sürme” variety growers’ income will be increased because yield and quality of crops will be rise as a result of obtaining the seedlings from the same seed or seeds. The result of this study can also be used as a reference for the studies propagation new varieties, transgenic plants and mutant species in future.



**KEYWORDS:** Watermelon, tissue culture, micropropagation

## KISALTMA VE SİMGELER

<b>MS</b>	: Murashige ve Skoog
<b>WPM</b>	: Woody Plant Medium
<b>SH</b>	: Schenk and Hildebrand Medium
<b>BA</b>	: 6-Benzil adenin
<b>Kin</b>	: Kinetin
<b>NAA</b>	: $\alpha$ Naftalen asetik asit
<b>IAA</b>	: İndol asetik asit
<b>IBA</b>	: 3-İndol butirik asit
<b>2,4-D</b>	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
<b>TDZ</b>	: Thidiazuron
<b>IPA</b>	: İndol-3-propionik asit
<b>Zea</b>	: Zeatin
<b>GA<sub>3</sub></b>	: Gibberellik asit
<b>NOA</b>	: $\beta$ -Naftaksi asetik asit
<b>g</b>	: Gram
<b>g l<sup>-1</sup></b>	: Gram /Litre
<b>w/v</b>	: Ağırlık/Hacim
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Milimetre
<b>mg l<sup>-1</sup></b>	: Miligram/Litre
<b><math>\mu</math>m</b>	: Mikrometre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>PGR<sub>s</sub></b>	: Plant growth regulator <sub>(s)</sub> (bitki büyüme düzenleyicisi)
<b>NaOCI</b>	: Sodyum hipoklorit
<b>CaOCI</b>	: Kalsiyum hipoklorit
<b>SÇKM</b>	: Suda çözünebilir kuru madde miktarı
<b>(SS)</b>	: Meyveden çıkarılan karpuz çekirdeklerinin sadece steril saf suda çalkalanıp besisi ortamına aktarılması

- SSÇ** : Meyveden çıkarılan çekirdeklerin steril saf suda çalkalanıp pens ve bistüri yardımı ile kabukları çıtlatılıp besi ortamına aktarılması
- %3+SS** : Meyveden çıkarılıp %3'lük NaOCI'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına (kabuklu) aktarılması
- %3+SSK** :Meyveden çıkarılıp %3'lük NaOCI'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına (kabuksuz) aktarılması
- %3+SSÇ** : Meyveden çıkarılıp %3'lük NaOCI'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına (çitlak) aktarılması.
- ZYMV** : Sarı mozaik virüsü
- CMV** : Kabak mozaik virüsü
- PEG** : Polietilen glikolun
- DAP** : Tozlanmadan sonra gün olarak geçen süre (days after pollination)



## 1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde bitkisel ürünler hayvansal ürünlere göre daha çok tüketilmektedir. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i, bitkisel kaynaklıdır (Mantentell ve ark., 1985). İnsanoğlu, yeryüzündeki 3000 bitki türünden besin maddesi olarak yararlanmaktadır (Hatipoğlu, 1999). Ancak, bunlardan 30'u dünya nüfusunun beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitki grupları içinde en önemlileri ise tahıllar, baklagiller, endüstri bitkileri, sebzeler ve meyvelerdir. Dünya nüfusunun 2000 yılında 6.2 milyar, 2025 yılında 8.3 milyar ve 2100 yılında ise 11 milyar olacağı tahmin edilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002). Yani bu yüzyılın sonunda, dünyadaki mevcut bitkisel kaynakların, şu andakinin 2 katına yakın bir nüfusu beslemesi gerekecektir. Bu durum, sadece sebzeçilik açısından değerlendirildiğinde; toplam 24 milyon tonluk sebze üretimine sahip dünya ülkelerinin, gelecekte bu üretimi iki katına çıkarmaları gerektiğini göstermektedir. Dünyada vejeteryan sayısının giderek arttığı gerçeği, sebze üretiminin diğer bitkilere göre daha fazla üretilmesini zorunlu kılacaktır. Bu durum, bazı ülkelerde tüketimi fazla olan sebze türlerinin önemini daha da artıracaktır. Bundan dolayı, üretim potansiyelini arttırmak için bitkilerde verim artırma çalışmalarına hız verilmiştir. 1990 yılından bu yana verimdeki artış hızında azalma gözlenmektedir. Bununla birlikte kişi başına düşen besin tüketimi sabitlenmiş olsa bile yakın bir tarih sayabileceğimiz 2025 yılına kadar, dünya besin üretiminde en az %57'lik bir üretim artışı sağlanması zorunludur. Aslında yapılan araştırmalar bugünkü verim düzeyinin bile potansiyel verimin altında olduğunu göstermektedir (Babaoğlu ve ark., 2002). Verimdeki artışların tarım alanlarındaki azalmadan kaynaklanan ürün kaybını karşılayıp karşılayamayacağı kuşku olduğundan, üstün teknolojilere duyulan ihtiyaç gittikçe daha çok önem kazanmaktadır. Tarım alanlarından daha yüksek verim ve daha kaliteli ürün elde etmek için üzerinde durulması gereken hususların başında bitki ıslahı gelmektedir.

Bitkilerde uygulanan ıslah çalışmalarında genellikle verim artırma çabalarına gidilmiştir. Oysa verim artırma çalışmaları beraberinde birçok yeni sorun getirmiştir. Bitkisel üretimde verim artışlarının daha çok bitkilerin genetik yapılarının ıslahı ve kullanılan girdilerin daha bilinçli bir şekilde kullanılması ile ortaya çıkmaktadır. Yapılacak ıslah çalışmalarında, uygulanan gübre ve suyu daha etkin bir şekilde kullanan, daha kaliteli ürün veren, hastalık ve zararlılara dirençli çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Ancak herbiri bir çok gen tarafından kontrol edilen bu karakterlerin klasik ıslah yöntemleriyle tek bir genotipte toplanması oldukça güçtür. Üstelik bu işin gerçekleştirilmesi her geçen gün daha da

zorlaşmaktadır. Çünkü herhangi bir kültür bitkisinin arzu edilen karakter yönünden ıslah edilebilmesi için, öncelikle söz konusu karakter yönünden varyasyon gösteren bir popülasyonun mevcut olması gerekir. Ancak, bir taraftan bugüne kadar sürdürülen ıslah çalışmaları ile ortaya konan yüksek verimli çeşitler, düşük verimli fakat bazı karakterler yönünden üstün özellikler gösteren genotiplerin ortadan kaybolmasına yol açarken, diğer taraftan da varyasyonun esas kaynağını teşkil eden kültür bitkilerinin yabani formlarının yaşadığı doğal alanların tahrip edilmesi, varyasyon kaynaklarının azalmasına neden olmuştur. Bu nedenle, arzu edilen karakterlere sahip verici genotiplerin seçilebilmesi için çok büyük popülasyonların incelenmesi gerekmektedir. Böyle bir iş ise çok zaman alıcıdır ve yoğun bir iş gücüne gereksinim duyulur. Bu durumda, mevcut bilinen bitki ıslah yöntemleriyle yeni bir çeşit geliştirmek için duyulan gereksinim zamanla daha da artacaktır (**Hatipoğlu, 1999**). Doğada uzun yıllar kendi halinde yetişmiş yerli popülasyonlar seleksiyon için büyük değer taşımaktadırlar. Bu popülasyonların yerini yeni ıslah çeşitleri aldıkça çok değerli genetik materyalin ortadan kaybolma tehlikesiyle karşılaşmaktadır. Bu nedenle bu gibi genotiplerin korunması ve ıslah çalışmalarında kullanılması üzerinde, önemle durulmalıdır. Bitki ıslahında yeni çeşitlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmaların başında ise yerel popülasyonların seleksiyon ıslahı ile homozigotlaştırılması ve üstün verimli ve dayanıklı çeşitlerin ortaya çıkarılması olmuştur (**Hatipoğlu, 1999; Akbay, 1988**).

Her ülkede hatta her bölge veya yörede ıslah değeri taşıyabilecek yerel bitkisel materyale rastlamak mümkündür. Büyüklüğü, lezzeti ve kendine has yetiştirme tekniği ile Diyarbakır karpuzu da yerel bir sebze olarak günümüze kadar varlığını koruyabilmiştir. Bölgemize şimdiye kadar sebze yetiştiriciliğinde modern kültür çeşitlerinin geniş ölçüde devreye girmemesi, yerel materyalin büyük ölçüde muhafaza edilebilmesini sağlamıştır. Yüksek sıcaklığa ve kurağa dayanım başta olmak üzere birçok ilginç özelliğe sahip olabileceği düşünülen ve bu yöreye gerçekten çok iyi uyum sağlamış olan yerel bitkisel materyalin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (**Abak, 1995**). Bunun yanında, GAP ile birlikte bahçe bitkilerine olan ilginin artmasına paralel olarak, bölgeye diğer sebze türlerinde olduğu gibi karpuzda da yeni çeşitler girmiş bulunmaktadır. Yörenin iklim ve toprak şartlarına adapte olması, hastalık ve zararlılara karşı gösterdiği direnç ile önemli bir gen materyali olan Diyarbakır karpuzunun, korunmaya alınarak biran önce ıslah çalışmalarını başlatmak gerekmektedir. Üzerinde henüz hiçbir çalışma yapılmamış olması ve yetiştirildiği bölgenin kabakgiller familyası için bir mikro gen merkezi özelliği taşıması, konunun önemini daha da

arttırmaktadır. GAP'ın tam kapasite ile devreye girmesiyle, iklimde değişmelerin olması ve bunun sonucu olarak; bölgedeki eski çeşit veya populasyonların kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalması beklenmektedir. Oysa ki bu populasyonların ıslah materyali olarak değerlendirilmesi, korunmaya alınması ve üzerinde çalışmalar yapılması; bölge sebzeçiliğinin gelişmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Klasik ıslah yöntemleri (seleksiyon) ile yapılacak böyle bir çalışma, uzun bir zaman ve masraf gerektireceğinden klasik ıslah yöntemlerine alternatif olarak biyoteknolojik yöntemler kullanılarak kısa sürede daha sağlıklı sonuçlar alınabilir.

Bitki fizyolojisi; bitki biyokimyası ve moleküler biyolojinin kullanımıyla geliştirilen modern bitki ıslahı yöntemleri kullanılarak, klasik bitki ıslahındaki sorunların çözümü kolaylaşmaktadır. Teknolojinin bitkilere uygulanması olarak tanımlanan **bitki biyoteknolojisi**; bitki, organ, doku ve hücrelerin, steril suni ortamlarda kültüre alınma ve genetik olarak değiştirilme tekniklerini içermektedir. Modern ıslah metodu olarak kullanılan bitki doku kültürleri; organogenezis, somatik embriyogenezis, protoplast kültürü ve füzyonu, haploid bitki üretimi, hastalısız bitki üretimi, sekonder metabolit üretimi, mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, embriyo kültürü ve somaklonal varyasyon gibi yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması hem zaman ve hem de uzun dönemde uygulandığı takdirde yapılacak masraflar açısından büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonunda kullanılan ve *in vitro* tekniklerin başında organogenezis ve mikroçoğaltım teknikleri gelmektedir. Dolayısıyla bu tekniklerin karpuz gibi sebzelerin ıslahında kullanımı oldukça önemlidir.

Bitki doku kültürü teknikleri günümüzde bitki biyoteknolojisinin en önemli entegre dallarından birisi olarak bitki bilimlerinin birçok alanlarında gittikçe artan bir hızla kullanılmaktadır. Buradaki temel güç, bu tekniklerin tek bir hücreye müdahale etme veya kontrol altına alma imkanını tanımasıdır. Bu nedenle, doku kültürleri; bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler biyolojide en çok başvuru alan yöntem ve araçlar arasında yer almaktadır. Organogenezis ise, hücre veya dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıdığı için, öncelikle generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Ayrıca, organogenezis bitki transformasyon çalışmalarının başarısını yakından etkilemektedir. Çünkü optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde, transformasyon yapmanın fazla bir anlamı yoktur. Diğer taraftan,



organogenesisin kendine has bazı önemli dezavantajları da vardır. Bunlardan en önemlisi bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon yönteminin olmayışıdır. Bu nedenle, her bitki türü, hatta her bitki çeşidi için spesifik bir sistemin optimize edilmesi gerekir. Benzer şekilde, her bitki türünde aynı oranda başarı elde etmek mümkün olmadığı gibi, bazı türlerde *in vitro* rejenerasyon tamamen imkansızdır. Fakat bütün bunlara rağmen, gelişen teknolojiler ve uygulamalara bağlı olarak organogenezisde başarılı olan türlere her geçen gün yenileri eklenmektedir. Hatta bazı araştırmacılar “*in vitro* kültür teknikleriyle rejenerasyonu yapılamayacak bitki materyali yoktur, yeterki ihtiyaç duyulan uygun şartlar belirlenebilirse!” diye iddia etmektedirler (Gürel ve ark., 2002). Organogenezisle, *in vitro* kültür şartları optimize edilen bir türün hatta çeşidin mikroçoğaltımı çok kolay olabilmektedir.

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.), yapay besi ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyacı, hormon ve kültür istekleri biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975). Bitkilerin *in vitro* üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast vb.) adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde tek-boğum yöntemi, aksiller dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve protoplastlardan bitki rejenerasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır (Mansuroğlu ve Gürel, 2002). Modern tarımda en fazla 150 bitki türünün tarımının yapıldığı ve bunların iyileştirilmesinde klasik yöntemlerin sınırına gelindiği düşünülürse, bitki doku kültürü tekniklerinin süratle geliştirilmesinin ve uygulanmasının önemi daha iyi anlaşılır. Bitki doku kültürünün en önemli uygulama alanları; mikroçoğaltım ve bunun bir sonraki aşaması olan, hücre seviyesindeki manipülasyon çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda ıslah hedeflerinin başında ise soğuğa, kurağa, tuza, ağır metallere, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi özellikler gelmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitkilerin mikroçoğaltılmasının (organogenezis, embriyogenezis ve mikroaşılama) avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Az bulunan bitkisel materyalin hızlı bir şekilde klonlanmasını sağlar.
- Kısır çeşitlerin çoğaltılmasında önemlidir.
- Uniform bitki populasyonlarının elde edilmesinde kullanılır.
- Bitki ıslahı için hastaliksız bitki stoklarının oluşturulmasında önem taşır.

- Yetiştirme mevsimine bağlı kalmaksızın yıl boyunca üretim yapılmasına olanak sağlar.
- İstenilen bir genotipten bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltılmasını mümkün kılar.
- Kültürlerde oluşacak somaklonal varyantlardan dolayı yeni varyetelerin geliştirilmesi mümkündür.
- Küçük bir alanda çok fazla üretimin yapılmasına olanak tanır.
- Altkültürler arasında bakıma gerek kalmaksızın kültüre alınmasına olanak sağlar.
- Bitki çoğaltılmasında otomasyona olanak sağlar.
- Transgenik bitkilerin klonlanması için bir araçtır.
- Sentetik tohum üretimine olanak sağlar.

Bu çalışmada, mevcut Diyarbakır karpuz çeşitlerinden yetiştiriciliği en yaygın ve yoğun olarak yapılan diploid ve tetraploid "Sürme" çeşidi için *in vitro* çoğaltma yöntemlerinden organogenezisle rutin olarak kullanılabilir bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, *in vitro* üretilen fidelerin ploidi seviyelerinin tespitinin yapılması da çalışmanın hedefleri arasındadır.

Bu çalışmanın, Diyarbakır karpuzu üzerinde gelecekte yapılacak diğer *in vitro* araştırmalara (kallus, süspansiyon kültürleri, anter kültürü, protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon) temel teşkil etmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Karpuz Hakkında Genel Bilgiler

#### 2.1.1. Orijini ve Tarihçesi

Karpuz, *Cucurbitaceae* familyasının *Citrullus* cinsine bağlı tek yıllık bir kültür bitkisi olup gen merkezi Afrika' dır (Decoteau, 2002). Karpuzun ne zaman kültüre alındığı tam olarak bilinmemekle birlikte, en az 4000 yıl öncesine dayandırılmaktadır (Sauer, 1993; Van Wyk, 2000). Karpuz kültürüne ilişkin en eski bulgular, tarih öncesi devirlere ait olup, eski Mısır resimlerinden elde edilmiştir. İlk olarak Mısır ve Hindistan'da başlayan kültürü, daha sonra tüm dünyada yayılmıştır. Yetiştiriciliği ise Akdeniz ve Hindistan'da ortaya çıkmıştır. Kültür çeşitlerinin Mısır ve Suriye üzerinden Anadolu'ya ve buradan da 15. yüzyıldan itibaren Avrupa'ya yayıldığı bildirilmektedir (Kütevin ve Türkeş, 1985; Ekinci, 1972). Amerika'ya ise Avrupalı koloniler vasıtasıyla götürüldüğüne inanılmaktadır. Bugün ise; Rusya'nın ılıman bölgeleri ile Çin ve Japonya'ya kadar yayılmış olan, oldukça önemli bir sebze türüdür. (Mohr, 1986).

Diyarbakır Karpuzu'nun tarihçesi ile ilgili olarak detaylı bilgiler bulunmamakla birlikte, şöyle bir olay anlatılır: “Lokman hekim, ölüme derman bulmak için yollara düşer. Bu yolculuğunda Diyarbakır'a da uğrar. Urfa kapısından içeri girer ve zerzevatçılar meydanına gelir. Orada gördüğü, uzun, iri patlıcanlar dikkatini çeker (Bu patlıcanlar, günümüzde “Şeyhkent” olarak bilinen yöresel çeşittir). Hayret ederek; “Bu patlıcanları yiyorlar da nasıl hasta olmuyorlar” der. Biraz daha yürüyüp de üst üste yığılı iri karpuzları görünce: “Yemekten sonra bu karpuzlardan bol bol yiyorlar, hastalanmayışlarının sebebi budur” demiş” (Beysanoğlu, 1972).

*Cucurbitaceae* familyasının tropik ve subtropik bölgelerde yaygın, 90 cinsi ve 700 kadar türü vardır (Yaltırık, 1989). Ülkemizde ise, 3 cins ve 8 türü doğal yayılış gösterir (Seçmen ve ark., 2000).

Cogniaux ve Harms ile Shimotsuma, *Citrullus* cinsine ait aşağıdaki beş karpuz türünün bulunduğunu bildirmişlerdir (Mohr, 1986):

*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsuma and Nakai

*Citrullus colocynthis* (L) Schrad

*Citrullus ecirrhosus* Cogn.

*Citrullus naudinianus* (Sond.) Hook

*Citrullus fistulosus*

*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai, orijini Güney Afrika olan tek yıllık bir bitkidir. Ülkemizde özellikle İç Batı, Güney ve Güneydoğu Anadolu'da kültürü yapılmaktadır (Seçmen, 2000). Bu türün iki alttürü bulunmaktadır; "*ssp. lanatus*" ve "*ssp. vulgaris*". Bu tür, büyük ve derin olarak bölünmüş 3 veya 5 loblu ya da lobsuz yapraklara sahiptir. Çiçekleri, açık sarı renkli ve genellikle monoiktir. Bazı eski çeşitlerde andromonoik çiçek yapısına rastlamak da mümkündür. Çiçek yapısından dolayı yabancı tozlanır ve tozlanma arılarıyla gerçekleşir. Meyve büyüklüğü, orta iri (3-5 kg) ile iri (15-20 kg) arasında değişir. Son yıllarda, sera yetiştiriciliğine elverişli, meyveleri 0.5-1.0 kg ağırlığında olan çeşitler geliştirilmiştir. Meyvelerinde su içeriği yüksek olup, et rengi kırmızı, sarı, pembe ve yeşil olabilir. Tohumları oval veya uzundur. Tohum rengi beyazdan kahverengi-siyaha kadar farklı tonlarda olabilir. Tohum irilikleri de çeşitlere göre farklılık göstermektedir. Üretimi yapılan çeşitlerin dahil olduğu bu türün kromozom sayısı,  $2n=22$ 'dir.

*Citrullus colocynthis* (L) Schrad.(ebucehil karpuzu); Kuzey Afrika kökenli çok yıllık bir bitkidir. Büyük olasılıkla, kanıt olmamakla birlikte bu tür karpuzun atası sayılır. Tek yıllık ve çok yıllık formları ve kserofitik olmasıyla oldukça yüksek polimorfiktir. (Jarret ve Newman, 2000) *Citrullus lanatus*'den daha çok organlarının boyutlarıyla ayırt edilir. Yaprakları dar loblu, küçük ve kaba batıcı tüylüdür. Çiçekleri küçük ve monoiktir. Petal yeşilimsi sarıdır. Meyveleri yarı küremsi 5-12 cm çapında, yeşil ve sarı renkte, tadı çok acıdır. Bu tür, özellikle virüslere dayanım hedefli ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu tür, ülkemizde Mersin yöresinde, sahile yakın yerlerde bulunur.

*Citrullus naudinianus* (Sond.) Hook ve *Citrullus ecirrhosus* Cogn; güney batı Afrika'nın çöl alanlarına uyum sağlamış çok yıllık bitkilerdir. *Citrullus naudinianus*'un vejetatif özellikleri diğer türlerden farklıdır. Yaprakları ince tüylerle yoğun olarak kaplıdır. Çiçek yapısı dioiktir ve çiçekleri büyümenin ikinci yılına kadar oluşmazlar. Meyveleri elips şeklindedir ve meyve büyüklükleri ortadan-iriye kadar değişmektedir. Tohumları beyaz renklidir.

*Citrullus ecirrhosus*; vejetatif özellikleri açısından *Citrullus colocynthis*'e benzer. Ancak yaprakları yoğun ince tüylerle kaplı ve daha bölmelidir. Sülükleri yoktur ve büyümenin ikinci yılına kadar çiçek oluşturmaz.

*Citrullus fistulosus*; genel özellikleri bakımından *Cucumis* türlerine benzer bulunmaktadır. Ayrıca kromozom sayısı açısından da ( $2n=24$ ) karpuzdan farklıdır. Diğer dört

türle hibritlenmeseydi yeniden sınıflandırılabilirdi. Bu türün dışındaki dört *Citrullus* türleri kendi aralarında başarıyla hibritlenmektedirler.

### 2.1.2. Biyolojisi

Karpuz çiçekleri genelde sarı renkte olup biyolojik bakımdan monoik karakterdedir. Az miktarda da olsa andromonoik çiçek durumuna rastlanır. Çiçekleri diğer *Cucurbitaceae* türlerine göre daha küçüktür. Tozlanma olayı böceklerle olup yüksek oranda kendine tozlanır. Kromozom sayısı  $2n=22$ 'dir (Şeniz, 1995; Mohr, 1986; Günay, 1992).

Diyarbakır karpuz çeşitlerinden "Sürme" çeşidine ait çiçek yapısı arazide teşhis edilerek tanımlanmıştır. Monoik çiçek yapısına sahip olup çiçekler sarı renklidir. Tohum ekiminden yaklaşık olarak 85 gün sonra çiçeklenme başlar. İlk açan çiçekler, erkek çiçek olup daha sonra dişi çiçekler açmaktadır. Sabahın erken saatlerinde çiçekler açık kalmakta ve daha canlı görünmektedirler. Bitki üzerinde çok fazla sayıda çiçek bulunmakta ancak bunların az bir kısmı meyve tutmaktadır. Özellikle Ağustos ayı boyunca görülen yüksek sıcaklıklarda, çiçeklerin büyük bir kısmı dökülürler. Diploid olan "Sürme" karpuzu  $2n=22$  kromozoma sahiptir.

#### 2.1.2.1. Erkek Çiçek

Sepaller 5 adet, tabanda birleşik, çanak şeklinde geniş bir tüp oluşturur ve yeşil renklidir. Sepaller de mızraksıdır. Bitki sepal yüzeyleri seyrek tüylü, boyları 8 mm, çanak 3 mm, dişler 5 mmdir. Erkek petallerin boyu 10-11 mm, oval şekilli, açık sarı renkli, arka yüzü yeşilimsi damarlı, damarların üzeri yoğun tüylüdür. Petalin ucu çok küçük, çıkıntılı ve stamenler 3 adettir. Erkek çiçeklerin sayısı dişi çiçeklere oranla daha fazla ve daha küçüktür. İlk açan erkek çiçeklerdir. Çiçekler, genelde 3 ve 4. ve daha sonraki boğumlarında görülmektedirler. Çiçek sap uzunluğu, 2-3 cm olmaktadır.

#### 2.1.2.2. Dişi Çiçek

Sepaller 5 adet, tabanda birleşik dar bir tablo oluşturur. Lineer şekilli 5-7 mm boyundadır. Dişler 4-5 mm boyunda, tabla 1.5-2 mm ve arka yüzeyleri seyrek tüylüdür. Dişi petaller 10-11 mm, eliptik, uçları çıkıntılı, arka yüzeyi yeşil damarlı, damar yüzeyi tüylü; stigma 3 loblu, 3 tane verimsiz stamen vardır. Dişi çiçekler, erkeklere oranla sayıca daha az fakat daha büyüktürler. Renkleri erkekler göre daha sarı tonda olup genelde 7. boğumda

oluşmakta ve ileriki boğumlara (10-14 ) kadar görülmektedirler. Çiçek sap uzunluğu 2-3.5 cm arasındadır.

### 2.1.3. Önemi

Karpuz iştah açıcı ve serinletici bir yaz sebzesidir. İçinde bulunan bol su ile bu görevi yerine getirir. Bu yüzden eski devirlerden beri sevilerek tüketilen bir sebze olmuştur. Oldukça yüksek oranda şeker içerir. Anadolu karpuzları, Orta Asya, Hindistan ve İran karpuzları karşısında daha az tatlı olmalarına rağmen, yine de %5-8 arasında şeker oranına sahiptir. Şekerin büyük çoğunluğu glikoz formundadır. Bu bakımından şeker kana çabuk karışır. Yaptığımız çalışmalarda, Diyarbakır karpuzundaki şeker oranı ise %8-10'dur. Karpuzda A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> vitaminleri yanında önemli miktarda C vitamini vardır. Karpuzun 100 gramında, B vitamini 0.006-0.05 g, C vitamini 0.7-1g civarında bulunur. Ayrıca, 0.5 g protein, 0.002 g yağ içerir. Madensel maddelerin miktarı fazla yüksek değildir (Günay, 1992).

Karpuz daha çok taze olarak yenir. Bununla beraber bazı Orta Asya ülkelerinde suyundan bira ve şarap yapılır. Ülkemizde ve diğer bazı ülkelerde, kabuklarından veya meyve etinden turşu ve reçel yapılır. Küçük meyveleri ve yaprakları pişirilerek yenir. Halk arasında, göz ağrılarında, mide rahatsızlıklarında, solucan düşürmede, balgam söktürmede, ağız kokusunun giderilmesinde ve baş ağrısına karşı karpuzdan yararlanır. Ayrıca karpuz tohumları kullanılarak hazırlanan bir karışım kozmetikte kullanılmaktadır. Acı olan yabani bir formu ilaç olarak kullanılmaktadır (Günay, 1992; Sauer, 1993; Van Wyk, 2000).

Dünyadaki yetiştiricilik sınırları oldukça geniş olan karpuz, üretim bakımından da önemli bir konumdadır. Dünya karpuz üretim miktarı, 2003 yılı verilerine göre, 83 199 791 ton'dur (Çizelge1). Çin, 58 434 289 ton'luk üretim ile toplam üretim içinde çok büyük bir paya sahiptir. Türkiye ise, üretim sıralamasında ikinci ülke konumundadır (Anonymous, 2004).

Türkiye'de 1 007203 ha'lık alanda 24 615 510 ton sebze üretimi yapılmaktadır. Bu üretimin yaklaşık 5 990 000 ton'luk kısmını *Cucurbitaceae* familyasına giren sebze türleri oluşturmaktadır. Karpuz yetiştiriciliği ise, 140.000 ha'lık alanda yapılmakta ve 3 900 000 ton civarında üretim gerçekleşmektedir (Anonymous, 2004). Bu rakamlara göre karpuz, üretim bakımından kendi familyasında %65'lik payla ilk sırada, tüm sebzeler içerisinde ise %15 lik payla 2. sırada yer almaktadır.



Çizelge 1. Dünya karpuz üretiminin ülkelere ve yıllara göre dağılımı (ton)

Yıllar	Dünya	Çin	Türkiye	İran	USA	Mısır	Meksika	Kore Cum.
1961	17.777.421	6.548.859	1.700.000	500.000	1.319.176	639.987	198.407	25.764
1962	19.067.184	6.579.562	1.782.000	550.000	1.313.642	779.293	337.213	31.955
1963	19.112.440	5.899.770	1.804.000	600.000	1.410.756	858.268	340.459	32.247
1964	19.548.819	5.245.143	1.980.000	630.000	1.250.774	844.015	339.994	46.522
1965	19.064.955	5.477.329	1.980.000	650.000	1.342.762	976.077	331.581	57.698
1966	20.005.471	5.504.161	2.100.000	680.000	1.289.829	1.134.348	337.405	55.258
1967	20.808.875	5.592.318	2.089.000	710.000	1.260.527	1.004.000	202.458	86.208
1968	21.156.722	5.793.024	2.160.000	730.000	1.252.634	898.000	185.187	103.792
1969	21.008.283	6.031.562	2.100.040	750.000	1.177.066	957.000	200.234	117.150
1970	19.462.867	4.635.843	2.170.000	775.000	1.241.612	898.000	203.605	119.405
1971	22.033.511	5.147.519	2.100.000	825.000	1.228.957	901.400	335.320	152.310
1972	20.991.168	4.486.227	2.200.000	878.000	1.146.676	1.008.500	281.531	148.888
1973	21.801.466	5.029.652	2.050.000	1.000.000	1.187.045	1.147.500	310.482	145.045
1974	21.853.860	4.985.927	2.400.000	1.100.000	1.044.799	1.213.000	312.623	175.195
1975	23.631.584	5.190.897	2.600.000	1.200.000	1.084.262	1.212.100	273.568	131.496
1976	24.240.903	5.229.778	2.900.000	1.300.000	1.199.746	1.366.541	326.118	226.354
1977	24.092.109	5.429.734	2.410.000	1.450.000	1.225.600	1.188.421	372.955	197.851
1978	25.008.079	5.716.925	2.550.000	1.600.000	1.146.222	1.318.491	474.435	213.030
1979	26.294.734	5.688.491	3.470.000	1.500.000	1.092.063	1.221.187	552.098	306.489
1980	26.257.218	5.471.410	3.000.000	1.700.000	1.030.375	1.157.370	446.598	334.598
1980	27.561.786	6.292.786	3.000.000	1.900.000	1.182.781	1.210.961	337.916	290.690
1982	28.590.432	6.267.986	3.100.000	2.088.500	1.184.000	1.082.722	470.539	369.907
1983	28.679.021	7.023.901	3.110.000	2.348.842	1.186.000	965.000	366.415	303.437
1984	29.414.212	7.838.452	3.100.000	2.659.703	1.195.000	1.183.000	494.889	389.221
1985	35.140.410	12.184.521	3.422.087	3.053.926	1.090.000	1.318.000	421.753	472.684
1986	35.441.474	12.753.206	3.000.000	3.285.362	1.110.000	1.314.000	388.208	483.097
1987	38.769.357	14.159.147	3.422.854	3.229.907	1.130.000	1.370.000	494.928	461.213
1988	37.368.424	14.575.081	3.300.000	1.728.305	1.130.000	1.165.000	460.073	545.741
1989	34.771.032	12.727.893	3.000.000	1.596.394	1.100.000	1.000.000	503.732	552.276
1990	34.443.714	10.955.371	3.300.000	2.645.989	1.100.000	1.007.000	404.077	593.228
1991	34.049.529	11.550.038	3.820.000	1.235.388	1.100.000	893.899	392.688	723.997
1992	35.871.594	14.537.100	3.680.000	1.764.866	1.695.700	711.307	499.047	841.630
1993	37.829.544	17.350.579	3.250.000	1.738.651	1.674.500	714.000	387.554	865.127
1994	37.759.012	17.396.491	3.600.000	1.314.000	1.729.500	923.000	427.957	858.025
1995	41.091.701	18.827.743	3.600.000	1.389.696	1.788.300	1.199.813	484.826	1.120.124
1996	46.667.406	23.815.047	3.900.000	2.061.122	1.938.000	1.126.560	533.709	866.499
1997	58.593.173	35.001.872	3.800.000	2.174.435	1.811.000	1.735.448	709.642	1.005.553
1998	59.883.549	35.795.327	3.925.000	2.472.857	1.677.000	1.409.405	698.489	807.282
1999	71.386.605	46.547.170	3.860.000	2.178.659	1.866.660	1.670.320	912.590	936.658
2000	75.335.067	51.821.168	3.900.000	1.650.040	1.686.700	1.785.280	1.048.529	922.746
2001	81.244.619	57.508.382	3.880.000	1.815.746	1.843.750	1.446.900	969.518	948.953
2002	85.518.015	61.034.289	3.900.000	1.900.000	1.778.250	1.450.000	857.806	839.644
2003	83.199.791	58.434.289	3.900.000	1.902.000	1.800.000	1.450.000	970.055	839.644

Kaynak: Anonymus (2004).

Ülkemizin toplam karpuz üretiminin büyük bir kısmı Akdeniz bölgesinde yapılmakta ve bir kısmı örtüaltı tarımı (alçak tünel) şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu bölgeyi sırasıyla, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri izlemektedir. Belli başlı karpuz üreticisi illerimiz; Adana, İzmir, Diyarbakır, Edirne, Mardin, Antalya, Şanlıurfa, Tekirdağ, Bursa, İstanbul, Ankara ve Balıkesir'dir.

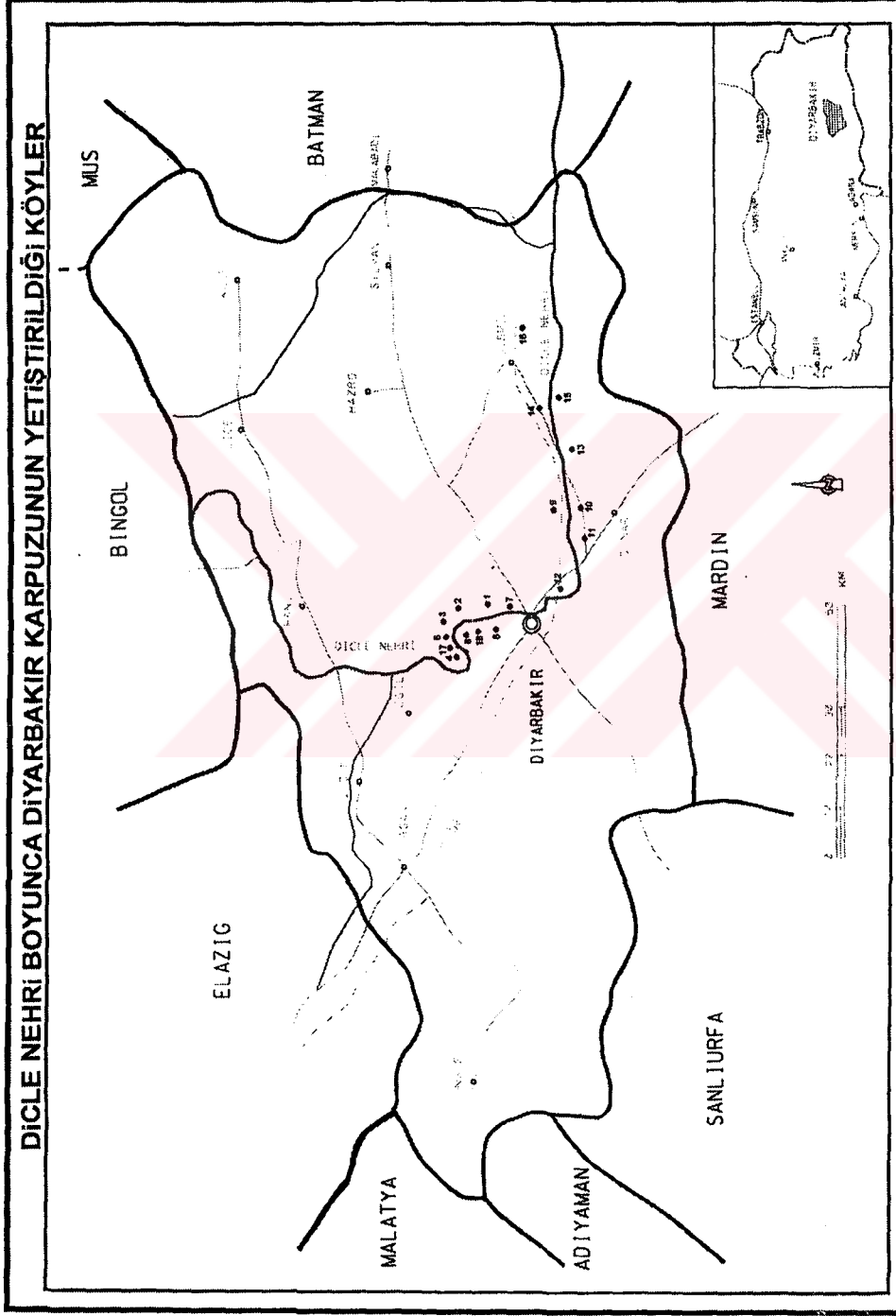
Anadolu'da birçok şehirde, sembol haline gelmiş ve o yöreyle özdeşleşmiş bir tarım ürünü vardır. Örneğin, kayısı dediğimizde Malatya, fıstık dediğimizde Gaziantep hatırlanır. Karpuz denince de aklımıza ilk gelen yer, büyük ve lezzetli karpuzlarıyla Diyarbakır ilimizdir. Gerçekten de karpuz, Güneydoğu Anadolu bölgesinde ve Diyarbakır'da yoğun bir şekilde üretilmektedir. Bunun nedenlerinden biri olarak; Bölgenin kabakgiller familyası için bir mikro gen merkezi olması gösterilebilir (**Demir, 1974**).

Diyarbakır'da, 6 655 ha alanda 226 670 ton karpuz üretimi yapılmaktadır (**Anonim 2004**). Bu üretimin önemli bir kısmını, başta Sürme çeşidi olmak üzere yerli çeşitler oluşturmaktadır. Diyarbakır için karpuzun ekonomik ve kültürel boyutu, yıllardan beri önemini korumuştur. Uzun yıllardan beri düzenlenen "Karpuz Festivali", hâlâ büyük ilgi görmektedir. İlk olarak 23 Eylül 1966 yılında düzenlenen Festival ile bu konuya el atılmış, üretici teşvik edilmek istenmiş ancak bir dönem sonra düzenli olarak yapılamamıştır. 1982 yılında konuya tekrar el atılmış, 1985 yılına kadar bu festivaller düzenli olarak tekrarlanmış ve en iri Diyarbakır karpuzu yetiştiren üreticiler ödüllendirilmiştir. Bu sayededir ki bu gün 40-45 kg'lık Diyarbakır karpuzu bulmak artık mümkün olabilmektedir (**Tekin, 1987**). Bu festivalde, karpuz üreticileri yetiştirdikleri karpuzları sergilerler ve büyüklük esasına göre sıralamaya girenlere ödül verilir. Bu karpuzlar, daha çok Dicle Nehri kıyısında bulunan köylerde (**Şekil 1**) bulunan **bostanlarda** (karpuz yetiştirilen tarla) yetiştirilir.

Dicle nehri kenarında çakıllı, kumlu arazilerde kendine özgü yöntemlerle yapılan karpuz yetiştiriciliğinin, yöre halkının ekonomik, sosyal ve kültürel yaşantısında önemli bir yeri bulunmaktadır. Birçok çiftçi geçimini karpuzdan sağlamaktadır. Karpuz yetiştiriciliğinde kullanılan güvercin gübresini temin etmek için, yörede "**Borahane**" denilen ve içinde sadece güvercin yetiştirilen kerpiç odacıklar günümüzde hâlâ kullanılmaktadır (**Resim 1**). Sadece karpuz tarlalarında bulunan ve "**Hülle**" diye adlandırılan gölgelikler de, tarımsal bir gelenek halini almıştır.

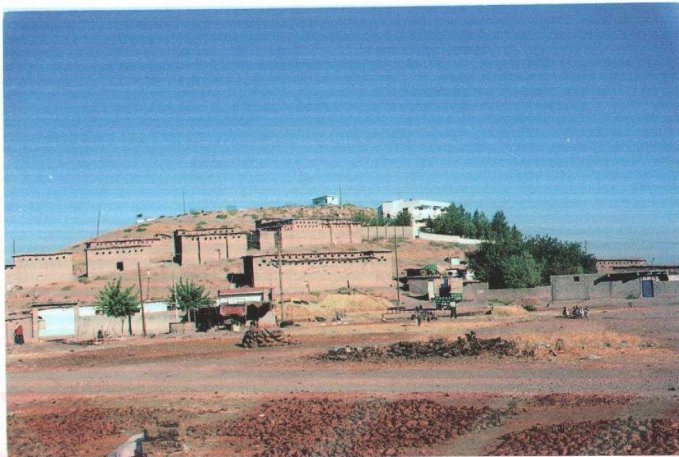
Yörede Diyarbakır karpuzu hakkında çeşitli mani ve türküler de yazılmış ve folklorik oyunlara (çayda çıra gibi) konu olmuştur. 1976 yılında "Diyarbakır Karpuzcular Derneği" kurulmuş, ancak bugün karpuz yetiştiricileri tarafından bile varlığı unutulmuştur. Diyarbakır Tarım İl Müdürlüğüne 1995 yılında "Diyarbakır Karpuzunu Kurtarma Projesi" başlatılmıştır. Islaha yönelik içeriği bulunmayan bu proje, yetiştiriciliğin yaygınlaştırılması yolunda faydalı olmuştur. Ayrıca, Başbakanlığa bağlı Tanıtma Fonu, 1998-2002 yılı karpuz festivali için 70 milyar lira ödenek ayrılmıştır. Böylelikle karpuz üretimine az da olsa ivme kazandırılmıştır.





- 1- Erimli
- 2- Dürümlü
- 3- Terzian
- 4- Sivritepe
- 5- Güzel
- 6- Tepe
- 7- Yk. Kılıçtaşı
- 8- Develi
- 9- Kervanpınar
- 10- Yuvacık
- 11- Şükürlü
- 12- Bağıvar
- 13- Başaklı
- 14- Ambar
- 15- Göksu
- 16- Tepe
- 17- Şahabar
- 18- Harbejan

*Şekil 1. Dicle Nehri Boyunca Diyarbakir Karpuzunun Yetiştirildiği Köyler.*



*Resim 1. Güvercin Yetiştirilen Borahane.*

#### 2.1.4. Diyarbakır Karpuzu Yetiştiriciliği

Diyarbakır karpuzu, gerek kendine özgü yetiştirme tekniği ve gerekse tadı ve iriliği ile eskiden beri kendinden söz ettirmektedir. Önceki yıllarda yetiştiriciliği oldukça yaygın bir durumdayken, zaman içerisinde Diyarbakır Karpuzu olarak bilinen “Sürme”, “Pembe”, “Beyazkış”, “Karakış” ve “Ferikpaşa” çeşitleri kaybolmaya yüz tutmuştur (Beşirli, 1991). Bu çeşitlerden sadece “Sürme”, “Beyazkış”, “Karakış” ve “Pembe” çeşitlerine ait bir miktar tohum bulunabilmiştir. Yıllardır ihmal edilen ve adeta yok olmaya bırakılan Diyarbakır Karpuzu, eski özelliklerini de yitirmeye başlamıştır. Eskiden yapılan “kuyu karpuzculuğu” yöntemi de bugün artık uygulanmamaktadır. Önceleri 70-80 kg gelen karpuzlar bu gün en fazla 40-45 kg gelebilmektedir. Çeşitler ve yetiştirme yöntemleriyle birlikte erozyona uğrayan Diyarbakır Karpuzu, aynı zamanda yetiştirme alanı ve yetiştirici bakımından da yok olmaya bırakılmıştır. Giderek azalan Diyarbakır karpuz yetiştiriciliği ne yazık ki yerini büyük ölçüde dışardan getirilen hibrit çeşitlere bırakmıştır.

Karpuzlar zamanı geldiğinde doğrudan doğruya hazırlanan yerlere ekilmek suretiyle üç şekilde yetiştirilir (Şeniz ve ark. 1995; Günay, 1992; Beşirli, 1991):

#### 2.1.4.1. Sıra (çizgi) Usulü

Ekim mevsimi geldiğinde çeşidin gelişme kuvveti ve toprağın karakterine göre genellikle 1.5-2 metre ara ile pullukla 5-6 cm derinlikteki çizgiler (karık) açılır. Bu çizgiler içersine hemen hemen aynı mesafe üzerinden ekim yapılır. Ekimde her ekim yerinde ileride seyreltmek üzere 3-4 adet tohum atılır ve tohumların iriliklerine göre 3-5 cm derinlikte kalacak şekilde üzerleri mümkünse gübrelü toprakla kapatılır ve hafifçe bastırılır. Tohumlarda çimlenme oranının yüksek olması için toprağın tavında olması gerekir.

#### 2.1.4.2. Ocak Usulü

Çizgi usulündeki ölçüler dahilinde yaklaşık 40-50 cm çapında ve 15-20 cm derinliğinde açılan çukurların diplerine 5-10 cm kalınlığında gübrelü toprakla yataklık konarak tohumlar bunun üzerine ekilir ve üzerleri 4-5 cm derinlikte kalacak şekilde kapatılır ve hafifçe bastırılır. Bazen de açılan bu çukurlara daha önce başka yerlerde çimlendirilmiş fideler dikilerek yetiştiricilik yapılır.

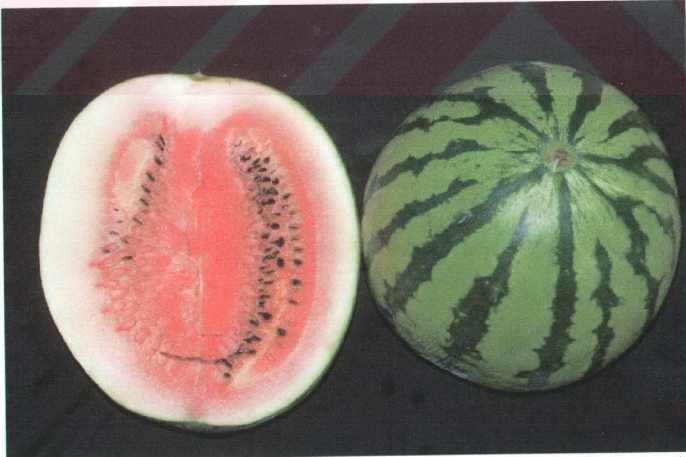
#### 2.1.4.3. Kuyu Karpuzculuğu

Bu metot, Dicle Nehri kıyılarında çakıllı ve milli topraklar üzerinde dünyaca meşhur iri Diyarbakır karpuzunun yetiştirildiği metottur (**Resim 2**).



*Resim 2. Diyarbakır'da Kuyu Karpuzu Yetiştiriciliği*

İlkbaharda genellikle Nisan ayı içerisinde sular tamamen çekildikten sonra birbirinden 3'er metre ara ile 1 metre uzunluğunda, 50 cm derinliğinde çukurlar açılır. Çukurun içindeki çakıllar dışarıya çıkarılır. En altta mümkün mertebe yalnız kum bırakılır. Çukurun iki başında nemli kum tabakası üzerinde çürümüş güvercin gübresinden birer kürek dolusu gübre doldurulur. Bu güvercin gübresi üzerine tekrar bir miktar nemli kum ilave edilir. Çukurun iki başında meydana getirilen bu yığın üzerine 3-4 adet karpuz tohumu ekilir. Bir hafta veya 10 gün içerisinde tohumlar çimlenerek körpe fideler gelişmeye başlar. Fideler 3-4 yapraklı olduklarında her yığmda kuvvetli bir fide bırakılarak diğerleri seyreltilir. Tohum ekiminden yaklaşık bir ay kadar sonra çukurun orta kısmına içerisine 2.5 kg kadar ahır gübresi karıştırılmış güvercin gübresi konur. Karpuzlar gelişip kolları uzadıkça çukurun içerisi bitkiler yukarıda kalacak tarzda bu defa ince nemli kumla doldurulmaya devam edilir. Mayıs ayı sonlarında her çukura 5'er kg kadar ahır gübresi ve güvercin gübresi karışımı verilir ve çukurun içersi toprak hizasına kadar aynı mülle doldurulur. Bu şekilde hazırlanmış besin maddelerince çok zengin ve nemli vasat içerisinde karpuz bitkisi çok kuvvetli kök sistemi meydana getirerek süratle gelişir ve neticede her biri 40-50 kg hatta daha iri olan karpuzlar elde edilir (**Resim 3**). Çukurlardan hasat edilen karpuz miktarı çeşidin iriliğine göre değişir. Genelde çok iri çeşitlerde her kökende bir karpuz buna rağmen daha küçük çeşitlerde yetiştiricinin arzusuna göre daha fazla sayıda meyve bırakılabilir.



**Resim 3.** Diyarbakır Karpuzu Sürme Çeşidine Ait Meyveler (iç ve dış görünüş)



Ayrıca yukarıdaki yetiştirme metodları dışında Diyarbakır ve yöresinde görülen **kuru tarım** şeklinde yapılan karpuz yetiştiriciliği de vardır. Bu tarz yetiştiricilikte elde edilen karpuz, “**Beji**” denir. Sulama yapılmaksızın yapılan karpuz yetiştiriciliğidir. Tohumların araziye ekilmesinden, sonra can suyu verilir ve sulama yapılmaksızın yetiştiricilik yapılır. Ancak gerek erkencilik ve gerekse de homojen üretim ve diğer fide ile yetiştiriminin avantajlarından dolayı karpuz yetiştiriciliği artık fideden yapılmaktadır. Fideliklerde yetişen fideler 1-1.5 ay sonra fideliklerden sökülerek araziye şaşırtılarak asıl yerlerinde yetiştirilmektedir.

### 2.1.5. Tez Konusunun Orijinalliği, Getireceği Yenilikler ve Sonuçlar

Karpuz, Diyarbakır ve yöresinde tüketimi ve üretimi oldukça fazla olan bir sebze türüdür. Ancak Diyarbakır karpuz çeşitleriyle ilgili olarak *in vitro* bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. Yöreye girmiş olan “Hibrit Karpuz” çeşitleriyle rekabet etme şansını yitiren Diyarbakır yerel karpuz varyetelerinin korumaya alınıp morfolojik ve fenolojik özelliklerinin (tez çalışması kapsamı dışında) belirlenip daha sonra ploidi (kromozom analizleri) çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Mikroçoğaltma ile üretilecek mevcut ve en önemli olan “Sürme” çeşidinin ıslah çalışması başlatılmış olunacaktır. Böylece yörede karpuz üretimi canlanıp, bölge ekonomisine katkı sağlayacaktır. “Sürme” çeşidi ve diğer çeşitlerin yok olması önlenmiş olup bu çeşidin üstün özelliklerinden ıslah çalışmalarında faydalanılacaktır.

Bu çalışmanın sonuçlanmasıyla gelecek yıllarda Diyarbakır karpuzuyla ilgili olarak yapılacak diğer çalışmalara (triploid karpuz, mikro aşılama ve transgenik karpuz) öncülük etmiş ve zemin hazırlanmış olunacaktır.

### 2.2. *In Vitro* Karpuz Rejenerasyon Çalışmaları

Karpuz bitkilerinin çoğaltımı; kotiledonlardan elde edilen sürgün rejenerasyonu ve somatik embriyogenezle sürgün ve nodların klonal mikroçoğaltımıyla olmaktadır. Aşağıda, bu güne kadar yapılan *in vitro* çalışmalarda her metod için geliştirilen yöntemlerin özeti ve önemi açıklanmıştır.

### 2.2.1. Sürgün Ucu Mikroçoğaltımı

Klonal hatların ve elit triploid kültürlerin çoğaltımında; 1 cm uzunluğundaki sürgün ucu en iyi eksplant tipidir. Sebze endüstrisinde, triploid çeşitlerin tohum ya da soğancıklarının pahalı olmasından dolayı mikroçoğaltım tercih edilir. Triploid tohumların çimlendirilmesinde sık sık karşılaşılan zorluklarına rağmen kullanımı mevcuttur (**Kihara, 1951; Elmstrom ve Maymand, 1992**). Triploid karpuz genotiplerin çoğaltım için, birçok araştırmacı doku kültürü metotlarını geliştirmeye çalışmıştır (**Barnes ve ark., 1978; Barnes, 1979; Angel ve Rosu, 1985; Adelberg ve Rhodes, 1989**). Bununla beraber zayıf köklenme ve aklimatizasyonla birlikte sürgün proliferasyon oranının düşük olmasından dolayı çoğu araştırmacıların geliştirdiği yöntemler başarısız ya da yetersiz olmuştur. 1 mg l<sup>-1</sup> BA içeren MS besi ortamında kültüre alınan 1 cm uzunluğundaki triploid sürgünleri, %1.25 NaOCl'te 5 dakika beklettikten sonra 6 kez steril distile su ile çalkalayarak sterilize etmişlerdir. 21 günlük inkübasyondan sonra 2-4 adventif sürgün verdiği rapor edilmiştir (**Compton ve Gray, 1992**).

1 mg l<sup>-1</sup> BA veya 2 mg l<sup>-1</sup> NAA ortamına aktarılan sürgünlerin yaklaşık olarak %70-90'ı kök oluşturmaktadır. Köklenen bu fideciklerden %60-85'i, aktarıldıkları seraya ve arazi şartlarına uyum gösterebilmişlerdir (**Compton ve ark., 1993a**). Bu yöntemler kullanılarak, 6 ay gibi kısa bir sürede, başta 100 sürgün ucu ile yapılan ilk kültürden yaklaşık 1.2 milyon bitki elde edilmiştir.

Herhangi bir türün mikroçoğaltımının çok pahalı olmasının nedenlerinden biri de bunun çalışma sisteminden kaynaklanmaktadır. Çoğu mikroçoğaltım sisteminde sık olarak sürgün ucu kültürü yapılmaktadır. Sürgün uçlarının dikkatli şekilde kesilmesi oldukça fazla zaman alır ve düzenli bir şekilde yeni besi ortamına aktarılması da zaman alıcı ve masraflıdır. Mikro sürgünlerin elle kesimini azaltmak için **Alper ve ark., (1994a, b)**, non-selektif kesimi ve karpuzların mikro sürgünlerinin mekanik olarak alınması için bir metod geliştirmişlerdir. Bu metotta diploid "Charlee" çeşidinin sürgün kültürü için özel bir alet yapılmıştır. Bu alet dikdörtgen bir ızgaraya sahip ve kesim bloğu bu kablolu ızgaraya uygun bir sapla bağlanmıştır. Mekanik transplantasyonda kombine edilen bu metod triploid genotiplerin mikroçoğaltımında masrafları büyük oranda azaltmıştır.

Triploid hibritlerin ıslahında kullanmak için, tetraploid genotiplerin klonal çoğaltımında karpuzun mikroçoğaltılması büyük bir potansiyele sahiptir (**Gray ve Elmstrom, 1996**). Tetraploid karpuz genotiplerinin üretimi için, diploid fidelerin sulandırılmış kolşisinle işleme tabi tutulması gerekir (**Kihara, 1958**).

**Gray ve Elmstrom, (1993)**, triploid hibrit tohum üretiminde kullanılan, tetraploid genotiplerin mikroçoğaltımı için bir yöntem geliştirip elde etmişlerdir. Bu yöntemde, tetraploid olarak tanımlanan arazi veya seradaki bitki gövdelerinden kesilen 2 cm'lik sürgün uçları, yüzey sterilizasyon için sodyum hipoklorit çözeltisinde (%2.6 NaOCl + %1 aktifleştirici) 3 dakika bekletildikten sonra birkaç kez steril distile suda çalkalamışlardır. Kesilen apikal meristemler, MS besi ortamı içeren petri kaplarında (100 mm x 15 mm tüp veya 100 ml x 15 ml) kültüre alınmıştır. 30 g l<sup>-1</sup> şeker, 1 mg l<sup>-1</sup> BA ve 7 g l<sup>-1</sup> agardan oluşan MS besi ortamının pH'sı 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. Sürgün uzamasını teşvik etmek için sakkaroz ve agarı aynı miktarda olan farklı besi ortamına 2 mg l<sup>-1</sup> kinetin ve BA yerine ise 8 mg l<sup>-1</sup> IAA ilave edilerek kullanılmıştır. Bu metodla elde edilen bitkilerin seraya aklimatizasyonu ve araziye transferi yapılarak, normal meyve üretmişlerdir. Bu bitkilerde veya dölleri arasında hiçbir somaklonal varyant görülmemiştir.

Yapılan başka bir çalışmada; uzama ortamının, sürgün gelişimi ortamının ilk meristem kültüründeki (MS + sakkaroz + agar, yukarıdaki ortam gibi) BA oranının düşürülmesi ile elimine edilebileceğini belirtmektedir (**Compton ve Gray, 1992; Compton ve ark., 1993a**). Sürgünler en az 2 cm olduklarında kolayca köklenmektedirler (**Gray ve Elmstrom, 1991**) ve bitkiciklerin yaklaşık %90'ı yüksek nemli ortamda aklimatizasyonda canlı kalmaktadır (**Compton ve ark., 1993a**). Bu prosedür kullanılarak, herhangi bir somaklonal varyasyon olmaksızın ilk orijinal ploidi seviyelerini muhafaza ederek %100 olgun bitki elde edilebilmektedir.

Karpuz için en iyi mikroçoğaltım uygulamaları diploid ve tetraploid steril erkek genotiplerin klonal çoğaltımıdır. İki steril erkek genotip tanımlanmıştır (**Zhang ve Rhardes, 1992; Feher, 1993; Zhang ve ark., 1994c**). Bunlar; tüylü steril erkek ve diploid steril erkek karpuz hattıdır. Tüylü yaprak özelliği steril erkek lokusu ile bağlantılıdır (**Watts, 1967**). Bu hatta erkek çiçekler steril polenlerle erkek çiçek üretmesine rağmen bitkilerde dişi çiçek verimliliğinde azalma gözlenmiştir. Kuzeydoğu Çin'de kendine tozlanan "Nongme 100" karpuz çeşidinde, kendiliğinden steril olan erkek mutantların tanımlanmasından sonra, ikinci steril erkek genotip **Xia ve ark., (1988)**, tarafından oluşturulmuştur. Mutantlar 617 AB ıslah hattını geliştirmek için kardeş hatlarla çaprazlanmıştır. Bu aynı zamanda "Çinli steril erkek" olarak da bilinir. M 59 ıslah hattından daha fazla agronomik özellikteki isteklere sahip olmaya ilaveten, G17AB'de erkek kısırılığı; MS olarak belirtilen tek bir lokus tarafından kontrol edilmektedir (**Xia ve ark., 1988; Zhang ve Warg, 1990**).

Erkek kısırılığının kullanımıyla, kontrollü, elle tozlaşma ihtiyacının elimine edilerek diploid ve hibrit triploid tohum üretim fiyatı büyük oranda düşmüştür. Erkek steril genotiplerin sorunu, homozigot resesif (Ms-ms) kısır-erkek bitkilerin üretimi için heterozigot hatlara (ms-ms) ihtiyaç duymalarıdır. Muhafaza edilen bu hatların kullanımı ile ms-ms bitkileri üretmek için **Gray ve Elmstrom, (1991)**, tarafından patentlenen mikroçoğaltım metodu ile elemine edilebilir.

### 2.2.2. Adventif Sürgün Organojenezisi

Adventif sürgün rejenerasyonu ile ilgili olarak, diploid ve tetraploid karpuz çeşitlerinde bir çok araştırma rapor edilmiştir (**Srivastava ve ark., 1989; Dong ve Jia, 1991; Compton ve Gray, 1993a**). **Choi ve ark. (1994)**, Diploid karpuz varyetesi kotiledonlarından adventif sürgün rejenerasyonu; genetik transformasyon çalışmaları ve **Compton ve ark. (1996)**, çekirdeksiz karpuz ıslahında ana bitki olarak kullanılan tetraploid somaklonal varyantların çoğaltılmasında ümitvar uygulamalara sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Karpuz fidelerinin, sürgün uçlarının mikroçoğaltılan ve fide kotiledonlarından rejeneren olan adventif sürgünlerden elde edildiği bir çok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (**Pirinç, 2003; Anghel ve Rosu, 1985; Compton ve Gray, 1993; Dong ve ark., 1991; Srivastava ve ark., 1989**). Bu çalışmalarda, *in vitro* çimlendirilen fide kotiledonlarının, en iyi eksplant kaynağı olduğu belirtilmiştir. *In vitro* fide elde etmek için, embriyolar tohumdan çıkarılıp, 10-25 dakika %1-3'lük NaOCl'te bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra 3-6 kez steril distile suda çalkalanmıştır. Sterilizasyonda, küçük tohumlu çeşitler 10-15 dakika %1'lik NaOCl'de, büyük tohumlular ise 20-25 dakika ve %1.3'lük NaOCl'de bekletilmeye ihtiyaç duyar. Bazı durumlarda ise, embriyoları çıkarmadan önce tohumlar %2.6'lık NaOCl'ye bırakıldıktan sonra 15 saat steril distile suda tutulmuştur (**Compton ve Gray, 1993a**).

**Punja ve ark. (1990)**, karpuzla beraber aynı familyada bir diğer türde olan hıyarla ilgili (*Cucumis sativus L.*) *in vitro* çalışmalarda eksplant kaynağı olarak kotiledon ve yapraklar kullanmıştır. **Shan (1984)**, domatesin (*Lycopersicon esculentum Mill*) *in vitro* çalışmalarında eksplant olarak kotiledon ve yaprakları kullandığını belirtmektedir. **Mohammet ve ark. (1992)**, fasülyede (*Phaseolus vulgaris L*) ve bakla (*Vicia faba L*) kotiledonlarının eksplant olarak kullanıldığını belirtmektedirler.

**Niedz ve ark. (1989)**, kavun (*Cucumis melo L.*) "Hahles's Best Jumbo" çeşidi ile yaptıkları çalışmada sürgün oluşumunun 4 ve 7 günlük kotiledonlarda, 18 günlük kotiledon ve



yapraklarına göre daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. **Christianson ve Warnick (1983)**, *Convolvulus arvensis* L.'de sürgün rejenerasyonunu belirlemek için yapılan çalışmada, kallus oluşumu için minimum 4 günlük ve sürgün başlangıç çalışmalarında ise 14 günlük yaprak eksplantlarına ihtiyaç olduğunu bildirmiştir.

Yapılan başka çalışmalarda ise 2-5 günlük fide kotiledonlarının en yüksek organojenik potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir (**Compton ve Gray, 1993a; Choi ve ark., 1994**).

**Compton ve Gray (1993a)**, diploid, triploid ve tetraploid karpuz kotiledonlarından sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, MS besisi ortamının 1 ve 2 mg l<sup>-1</sup> BA ile desteklenmesiyle, kinetinin (4 mg l<sup>-1</sup>) ve thidiazuronun (0.2 mg l<sup>-1</sup>) en iyi konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında en yüksek sürgün oluşturan eksplant oranının ve eksplant başına sürgün sayısının elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı diploidlerde (%37 ve 2.2), triploid (%22 ve 0.6) ve tetraploidlere (%20 ve 0.8) göre daha yüksek bulunmuştur. Köklenme ortamı olarak, 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 2 mg l<sup>-1</sup> NAA ile desteklenmiş MS besisi ortamı kullanılmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ise 5, 10, 15 ve 20 günlük kotiledonlardan; en yüksek 5 günlük kotiledonların kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir. Yani genç fidelerden alınan eksplantların (kotiledon) kullanılması halinde, sürgün oluşumunun daha fazla olacağını belirtmişlerdir.

*In vitro* karpuz çalışmalarında kullanılan embriyolar, belli ışıkta veya karanlıkta çimlenebilirler. Buna rağmen kotiledonların organojenik kabiliyetlerinin gelişmeleri; karanlıkta çimlendirilen tohumlardan elde edilen fidelerde olduğu rapor edilmiştir. **Compton, (1999)**, embriyoların ışıkta ve karanlıkta çimlendirilmesinin kotiledonlarından itibaren sürgün organojenezisine etkisini tespit etmiştir. Çimlenmesi karanlık ortamda gerçekleştirilen tohumlardan oluşan 5 günlük kotiledonlar sürgün rejenerasyonu için eksplant olarak kullanılmıştır. 7g l<sup>-1</sup> agar, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 1 mg l<sup>-1</sup> BA desteklenmiş MS besisi ortamının pH' ı 5.8 olarak ayarlanıp karanlıkta ve ışıklı ortam olarak 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> floresan lambalar kullanılmıştır. Kültürler 3 haftada bir altkültüre alınmıştır. Bu çalışmada, sürgünlere ait ölçümler 4 haftalık kültür sonunda alınmış olup 1.5-2 cm uzunluğa sahip sürgünler hasat edilebilir sürgün olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, karanlıkta çimlendirilen embriyolardan oluşan sürgün oranı, ışıkta çimlendirilerek elde edilen sürgün oranından daha yüksek (tüm çeşitler için) bulunmuştur. **Evans ve ark. (1981)**; keza **Hartmann ve ark. (1997)**, karanlıkta bekletmenin etkisinin ne olduğu tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bitki

dokularının karanlıkta inkübasyonu; ışığa duyarlı bazı bitki büyüme düzenleyicilerini ve diğer bileşikleri koruduğunu bildirmektedirler.

Kotiledonların apikal uçlarının genelde yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Compton, 2000). Bazı çalışmalarda ise; tüm kotiledon ya da yarım kotiledonların her ikisi de eksplant olarak kullanılmıştır (Compton ve Gray, 1993a; Choi ve ark., 1994). Bununla birlikte bazı çeşitlerde, özellikle rejenerasyon yeteneği düşük olanlarda, tüm kotiledonlar kullanıldığında daha iyi rejenerasyon oranı elde edilmiştir (Compton, 2000).

Pirinç ve ark. (2003), Sürgün organojenezisi üzerine iki tip sitokin; BA ve kinetinin farklı konsantrasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç; 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA içeren besi ortamından elde edilirken bu oran aynı zamanda kinetinin en iyi sonuç veren konsantrasyonundan (1 mg l<sup>-1</sup>) yaklaşık %50 daha fazla olduğu görülmüştür. Elde edilen sürgünlerin (1-2 cm) *in vitro* ortamda köklenmesi; 1 mg l<sup>-1</sup> NAA ile desteklenen MS besi ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. Rejenere edilen bitkilerin %50'den fazlası başarılı bir şekilde toprağa aktarılmıştır. Yapılan bu çalışmada, "Sürme" karpuz çeşidinin *in vitro* yöntemle çoğaltılabileceğini bildirmişlerdir.

Compton ve Gray (1994), tetraploid karpuzunun 4 farklı hibrit hattının (F92U8, SP90-1, SP90-2 ve SP90-4) kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ile yaptıkları rejenerasyon çalışmasında olgun tohumları veya 2, 4, 6, 8 ve 10 günlük fideleri kullanmışlar. Eksplantlar önce 8 hafta sürgün rejenerasyon ortamında ve bunu izleyen 4 haftalık sürgün uzama ortamında inkübasyona alınmışlardır. İki günlük kotiledonlardan, F92U8 ve SP90-2 hatlarında elde edilen en yüksek sürgün oluşum oranı sırasıyla, %66 ve %60 olarak bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı eksplant kaynağının yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. En fazla sürgün oluşumu, 2 ve 4 günlük fideden alınan eksplantlarda görülürken 4 günlük ve daha yaşlı bitkilerden alınan eksplantlar ise daha az sayıda sürgün oluşturmuşlardır.

Compton (2000), karpuz kotiledonlarında sürgün organojenezisi üzerine eksplant büyüklüğü ve çeşit etkisini araştırmıştır. Kotiledonların proksimal kısmının eksplant olarak kullanıldığında yaklaşık olarak %52'si sürgün verirken distal kısmının eksplant olarak kullanılması durumunda ise bunların yaklaşık %6'sı sürgün vermiştir. Proksimal basal uc eksplantında sürgün oluşumu sınırlı iken distal kısmının kullanımında ise herhangi bir sınır yoktur. Yarı basal kısmından üretilmiş sürgün oranı; ¼ basaldan üretilenden daha fazladır. Bu durum özellikle "Sweet Gem", "Crimson Sweet" ve "Minilee" çeşitlerinde görülürken

“Yellow Doll” çeşidinde ise eksplant boyutu sürgün rejenerasyonunu etkilemiştir. Yani çeşit ve eksplant arasındaki interaksiyon önemli bulunmuştur. Bundan dolayı, düşük rejenerasyon gösteren çeşitlerde bu sorunu göz önünde bulundurmamak gerekir.

**Adelberg ve ark. (1994)**, tarafından kavunda doku kültüründen tetraploid sıklığına eksplant tipinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, eksplant olarak adventif ve aksiler sürgünler kullanılmıştır. Bu sürgünler 2 mg l<sup>-1</sup> BA içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. Miniloup ıslah hatlarına, L-14 ve B hattına genetik kaynak olarak şu eksplantları kullanmışlardır; tohum kısımları (apikal ve kotiledon dokuları), olgun tohum (tozlanmadan 10-40 gün sonra, DAP) ve kotiledon parçaları olan, apikal-radikal aksislerdir. Bitkilerin ploidi seviyeleri ise polen morfometrisi ile görünmüştür. “Miniloup” ıslah hattının tohumlarından oluşan olgunlaşmamış kotiledonlar, olgun kotiledonlardan daha fazla tetraploid rejenerant üretmişlerdir. En yüksek tetraploid rejenerant bitki sıklığı 18 ve 22 (DAP) günlük iken hasat edilen embriyo kotiledonlarında görüldüğü belirtilmiştir. Aynı tohumun apikal meristemleri birkaç adet veya hiç tetraploid bitki üretmemişlerdir. Üç genotipin (Miniloup, L-14, B hattı) olgun olmayan kotiledonunun proksimal kısmı; olgun veya olgun olmayan tüm kotiledonlarından daha yoğunlukta tetraploid üretmişlerdir.

Olgunlaşmamış kotiledonlardan da sürgün rejenerasyonu rapor edilmiştir (**Zhang ve ark., 1994a**). Bununla birlikte, olgunlaşmamış tohumu gelişmenin doğru döneminde elde etmek zordur. Çünkü arazide olgunlaşmamış bitkiye ihtiyaç vardır. 0.5-1.0 cm boyundaki hipokotillerden sürgün rejenerasyonu rapor edilmiş fakat oranı düşük elde edilmiştir (**Srivastava ve ark., 1989**). Klonal çoğaltım için sürgün rejenerasyonunda, mikroçoğaltılan sürgünlerden, arazide yetiştirilen bitkilerden veya seradaki yapraklar, en çok tercih edilen eksplant kaynağı olurken yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu henüz başarısız olmuştur (**Compton ve Gray, 1993a**).

Karpuzun sürgün organogenezisiyle ilgili olarak tüm raporlarda, kullanılan besi ortamı **Murashige ve Skoog (1962)** tarafından ana hatlarıyla formüle edilen makro ve mikro besin elementleri ve vitaminlerden oluşan MS'tir. Bunlara, litrede 0.8 gr inositol ve 30 gr sakkaroz ilave edilmektedir (**Srivastava ve ark., 1989; Dong ve Sia, 1991; Choi ve ark., 1999; Compton, 1999 ve 2000**).

**Compton ve ark. (1992)**, diploid ve tetraploid karpuzların mikroçoğaltımına yönelik olarak yaptıkları çalışmada, MS besi ortamını kullanmışlardır. Yapılan çalışmada, diploid karpuzlarda, sürgün sayısı; 6.2 ve sürgün uzunluğu ise 0.69 cm olarak bulunmuştur

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak, sadece 1–2 mg l<sup>-1</sup> BA eklenmesiyle optimum sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Srivastava ve ark. 1989; Compton ve Gray 1993a; Choi ve ark. 1994; Jawarski ve Compton, 1997; Compton, 1999).

Dabauza ve ark. (1997), *Citrullus colcyntis* (L) Schrad karpuzunun transformasyon çalışmalarında, eksplant olarak kotiledonları kullanmışlardır. Araştırmada; kotiledonların morfogenetikine hormonların etkisini test etmek için, tek başına 6-benzilaminopurin (BAP) veya naftalin asetik asitle veya indol asetik asit kombinasyonları kullanılmıştır. Bunlar arasında en iyi sonucu ise BA'nın tek başına kullanıldığı (5 mg l<sup>-1</sup>) ortam vermiştir. Elde edilen sürgünlerin uzaması için ise, uzama ortamı olarak, 0.1 mg l<sup>-1</sup> BA'da sürgünler çok iyi gelişme göstermişlerdir. Sürgünlerin köklenmesi için ise, sürgünler 0.5 - 1 mg l<sup>-1</sup> indolbutirik asit (IBA) ortamına aktarılmış ve köklenme bu ortamda sağlanmıştır. Daha sonra köklenen fiducikler önce sera daha sonra araziye aktarılarak normal meyveler vermişlerdir.

Choi ve ark. (1994), adventif sürgün rejenerasyonu ve genetik transformasyon çalışmalarında, eksplant olarak diploid karpuz kotiledonlarının önemli potansiyel olarak kullanıldığını belirtmektedirler. Kotiledonlardan sürgün rejenerasyonu için de besi ortamı olarak MS besi ortamının kullanılabilceği belirtilmiştir. Kullanılan MS besi ortamı, 1 mg l<sup>-1</sup> BA ile desteklenmiştir.

Dong ve Jia (1998), tarafından, 4 mg l<sup>-1</sup> Indol-3-asetik asit (IAA) eklenmesiyle bazı genotiplerde eksplant başına düşen sürgün sayısını artırdığını rapor etmişlerdir. BA'nın yerine 1-8 mg l<sup>-1</sup> kinetin, zeatin veya 2-izopentiladenin ya da 0.2-2 mg l<sup>-1</sup> thidiazuronun kullanılması halinde, sürgün gelişimi yavaşlamıştır (Dong ve Jia, 1991; Compton ve Gray, 1993a).

Karpuz kotiledon parçalarının farklı jelleştirici ortamlar kullanılmıştır, Litreye 7-10 gr TC agar (Compton ve Gray, 1993a), 5 gr AgarGel (Compton, 1999), veya 4 gr Gelrit kullanıldığında en iyi rejenerasyon olduğu gözlenmiştir. Eksplantların sıvı ortamda inkübasyona alınması, bitki rejenerasyonunu %75'ten %50'ye düşürmüş ve çoğu sürgünler vitrifiye olmuşlardır (Choi ve ark., 1994).

Kotiledonların, sürgünlerin ve tomurcukların; bitki büyüme düzenleyicisiz ortamda (Compton ve Gray, 1993a) veya 1 mg l<sup>-1</sup> kinetinli (Dong ve Jia, 1991), ortamda kültüre alınması birçok genotipte sürgün uzamasını geliştirmiştir (Compton ve Gray, 1993a, 1994).

15 mm'den daha büyük sürgünler; 2 mg l<sup>-1</sup> IAA (Compton ve Gray 1993a), veya 1 mg l<sup>-1</sup> NAA'li (Dong ve Jia, 1991), ortamlarda kolay köklenebilmektedirler. Diğer kabakgil türleri için de, benzer sonuçlar elde edilmiştir (Compton ve ark., 2001).

**Compton ve ark. (1993)**, diploid ve tetraploid karpuzlarda sürgün ucu için bir mikroçoğaltım yöntemini geliştirdikleri çalışmada, 21 günlük ve 1 cm uzunluğundaki bir nodlu sürgünleri materyal olarak kullanmışlardır. MS besi ortamına; 7g l<sup>-1</sup> agar, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz eklenmiştir. Sürgün proliferasyonu için ise BA, TDZ ve kinetin kullanmışlardır. Besi ortamının pH'ı 5.7 olarak ayarlanmış ve kültürler büyüme odasında, 30-50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ortamına konulmuştur. Altkültür sayısının sürgün proliferasyonuna ve köklenmeye etkisini test etmek için kültürler 4 haftalık periyotlarla 6 ay boyunca altkültüre alınmışlardır. Köklenme ortamı olarak MS + 1 mg l<sup>-1</sup> IBA kullanılmış ve 5-30 mm uzunluğundaki sürgünler tercih edilmiştir. Substrat olarak otoklavda steril edilmiş vermikulit kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada, en iyi sürgün proliferasyonu, 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA ortamında 6.2 adet sürgün sayısı ve 6.9 mm sürgün uzunluğu (diğer sitokininlerden 1.5-2.8 kat daha fazla) elde edilmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısının 3. ve 4. altkültürlerde bir azalma olduğu fakat ilk iki altkültürde artış olduğu gözlenmiştir. Köklenme oranı ise genotipe ve kültür süresine bağlı olarak; %60 ile %100 arasında olmuştur. Aklimatizasyona alınan bitki oranı ise %60-%90 arasında değişmektedir. Yapılan bu çalışmayla sürgün ucunun 6 aya kadar köklenme oranları ve aklimatizasyon oranlarında önemli bir azalma olmaksızın altkültürünün yapılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada 3 ay gibi bir sürede 250 materyalden 13 200 adet bitki üretilmesi mümkündür.

Karpuz rejenerantların aklimatizasyonunda; optimum şartlar sağlandığında hiçbir problem olmaz. En az 1 cm uzunlukta bir ana köke sahip olan ve 1.6 cm'den büyük sürgünlerin yeterli bir aklimatizasyon ve rhizogenesis (90-100) gösterebilmesi için içerisinde eşit hacimlerde vermikulit veya perlit içeren saksılara konduğunda daha iyi bir gelişim gösterir. 1.6 cm'den küçük sürgünler ise daha düşük (%55) köklenme ve aklimatizasyon göstermişlerdir (**Compton ve ark., 1993a**).

Saksılara şaşırtma sırasında, birkaç saat öncesinden ortam nemlendirilir ve temiz plastik bir örtü ile bitkilerle temas etmeyecek şekilde kapatılır. Bitkicikler *in vitro* kültürdeki şartlara benzer şartlarda (16 saat fotoperiyotta 50 µm m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> ışık ve 25 °C sıcaklık) inkübasyona alınır. Aklimatizasyonun nemsiz serada olması istenir, çünkü bitkicikler nemden çok doymuş olabilir ve hızla çürür (**Gray ve Elmstrom, 1998**). Bu şartlarda, kullanılan bitkiciklerin %75-90'ı hayatta kalmaktadır. Çimlenmeden aklimatizasyona kadar ihtiyaç duyulan süre toplam 14 haftadır (**Compton ve Gray, 1993a, 1994; Compton ve ark., 1996; Jaworski ve Compton, 1997**).



Bugüne kadar *in vitro* da çalışılan tüm karpuz genotiplerinde, kotiledon eksplantlarından sürgün verme yetenekleri rapor edilmiştir (Srivastava ve ark., 1989; Dong ve Jia,1991; Compton ve Gray, 1993a, 1994; Choi ve ark., 1994; Zhang ve ark., 1994a; Compton ve ark., 1996; Compton, 1999 ve 2000). Bununla birlikte, yeni genotiplerle deney yapılırken genel yöntemde bazı düzenlemeler yapmak gerekli olabilir.

Diploit fidelerin kotiledonlarından sürgün rejenerasyonunun, tetraploit genotiplerden 2-3 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Compton ve Gray, 1993a). Triploit bitkilerden adventif sürgün rejenerasyonu düşük olmaktadır (<%30). Test edilen genotipe bağlı olarak yukarıda tanımlanan şartlar kullanılarak kültüre alınan kotiledon eksplantların %20-55'inde 3-20 arasında sürgün rejenerasyonu mümkün olabilmektedir.

Compton ve Gray (1992), triploid ve tetraploid karpuzların hızlı çoğaltımı için mikroçoğaltım tekniğini geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada; 1 cm uzunluğundaki sürgünler, 7g l<sup>-1</sup> agar, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz 0,2 mg l<sup>-1</sup> BA içeren MS besi ortamında (ışık gücü olarak 30-50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) gelişmeye bırakılmış ve 3 haftalık periyotlarla altkültüre alınmışlardır. Bu ortamdan gelişen 5-30 mm uzunluğundaki sürgünler, 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 1 mg l<sup>-1</sup> IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında köklenmeye alınmışlardır. Kültür süresince triploid kültürlerde eksplant başına en fazla sürgün sayısı, köklenme oranı ve aklimatize edilen bitki oranı sırasıyla; 3.8, %90 ve %85 olarak bulunmuştur. Tetraploid kültürlerde ise en yüksek sürgün sayısı, köklenme oranı ve aklimatize edilen bitki oranı değerleri sırasıyla; 5.2, %88.9 ve %68.9 olarak bulunmuştur.

### 2.2.3. Somatik Embriyogenesis

Somatik embriyogenesis ile bitkiciklerin elde edilmesinin bir çok avantajı vardır. Genelde gelişmiş sürgünlere ve vasküler bağı olan köklere sahiptir. Bu sistem genellikle daha yüksek embriyo ve bitki rejenerasyon oranı göstermektedir (Ammirato, 1987).

Somatik embriyogenesisle karpuz fidelerinin rejenerasyonu ilk defa Compton ve Gray (1993), tarafından rapor edilmiştir. Etkili bir somatik embriyogenik sistemin geliştirilmesi genetik transformasyon ve sentetik tohum üretimi çalışmalarında faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Bugün somatik embriyogenesisin genetik transformasyonu için kullanımı sınırlıdır; çünkü karpuzda embriyogenik doku oluşum sıklığı oldukça düşüktür.

Compton ve Gray (1993b), 4 karpuz genotipinin (Allsweet, Crimson Sweet, Minilee ve Flash87-Gate) somatik embriyogenesisini, tozlaşmadan 14-28 gün sonra hasat edilen



meyvelerden alınan olgunlaşmamış tohumların kotiledon eksplantları üzerinde gözlemlenmişlerdir (DAP). Bu çalışmada; optimum embriyo üretimi, eksplantların 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D ve 1 mg l<sup>-1</sup> thidiazuranla desteklenmiş MS besi ortamında oluşmuştur. 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonu veya TDZ'nin yerine BA kullanılması, embriyogenik potansiyeli düşürmüştür. Dinlenme halindeki embriyolardan izole edilen kotiledon eksplantları, kültür ortamında verilen hiçbir bitkisel hormona tepki göstermemiştir. Somatik embriyogenesisin başlatılması tozlanmayı takiben gelişen olgunlaşmamış tohumların kullanılmasıyla artmaktadır. Buna rağmen verilen tepki %25'i hiçbir zaman geçmemiş ve eksplant başına da 5.5 embriyo oluşmuştur. Somatik embriyoların çimlenme oranı da düşüktür (maksimum %46). Bunun nedeni, bu çeşit embriyoların tam olarak gelişmemesidir. Bu durum, kotiledonların birleşmesinden ya da birleşik somatik embriyo ve fonksiyonel bir apikal meristem üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Somatik embriyogenezisle test edilen karpuz çeşitlerindeki başarı oranı arttırılmadıkça karpuzun bu metotla çoğaltılması önerilemez. Adventif sürgün rejenerasyonu ile karşılaştırıldığında, düşük rejenerasyon oranı ve olgunlaşmamış tohum elde etme zorlukları, bu tekniğin kullanımını imkansız kılmaktadır.

#### **2.2.4. Hastalıklara Dayanıklılığın Geliştirilmesinde Doku Kültürü ve Biyoteknolojik Uygulamalar**

Karpuz için çeşit geliştirmede en yaygın olan biyoteknolojik yaklaşımlar; transgenlerin entegrasyonu için genetik transformasyonun kullanımını ve poliploid bitkiler üretmek için somaklonal varyasyonlardan yararlanılmasını kapsamaktadır. Her iki metotta da karpuzun genetik özelliklerinin geliştirilmesi için ümitvar sonuçlar elde edilmiştir.

##### **2.2.4.1. Genetik Transformasyon**

Bakteriyel, fungal ve viral hastalıklara hassas olmasından dolayı, karpuzun ıslahı genetik mühendisliği çalışmaları için önemli bir konudur. Geleneksel ıslah yöntemleriyle; antraknoza, *fusarium* solgunluğu ve gövdede zamk hastalıklarına, önceden karpuz mozaik virüsü 1 olarak bilinen *Papaya ringspot* virüsü, ve meyve leke hastalığı gibi bakteriyel hastalıklara dayanıklı çeşitler elde edilmiştir (Mohr, 1986; Ranr ve Zaten, 1992; Feher, 1993; Gillaspie ve Wright, 1993; Crall ve ark., 1994). Hastalıklara dirençli yeni çeşitler geliştirilmesine rağmen, pazara ürün sunabilme ihtiyacını karşılamak için çeşitlerin yıllık arazi rotasyonunu ve kimyasal uygulanması iki katına çıkmıştır.

**Choi ve ark. (1994)**, tarafından *Citrullus* için, genetik transformasyon rapor edilmiştir. Raporter gen olarak 35 S promoter- $\beta$ -glicuronidase (GUS) gen füzyon ürünü taşıyan ikili vektör PB1121'i içeren *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 ırkı ve nos-promoter-neomisinofosfotransferaz marker geni kullanılarak kotiledon eksplantların transformasyonunu sağlamıştır. Histolojik olarak incelenen rejenere edilmiş sürgünlerin yaklaşık %16'sı GUS aktivitesi ekspresyonu yapmıştır.

Transformasyon süresince *in vitro* transgenik bitki ve sürgünlerin tanımlanması, kanamisin içeren besi ortamında seçim için *nptII* geninin kullanımıyla olmuştur (**Choi ve ark., 1994; Tricoli ve ark., 2002**). Karpuzda transgenik bitki üretmek için *in vitro* fosfomanoz isomeraz pozitif seçim metodu başarıyla yapılmıştır (**Reed ve ark., 2001**).

Biolistik metodların kullanılarak rekombinant DNA'nın dağıtılması, *Agrobacterium* aracılıklı transformasyona alternatif gibi görünmektedir (**Compton ve ark., 1993b**). Gen silahı kullanılarak partiküllerin bombardımanından sonra kotiledonlarda GUS ekspresyonunu geçici olarak optimize etmek için gerekli parametreler **Compton ve ark. (1993b)**, tarafından tanımlanmıştır. Bu metodla GUS'ın optimum ekspresyonu rapor edilirken, rekombinant DNA'nın integrasyonunda başarılı olunmamıştır. Karpuzun genetik olarak modifikasyonu için en iyi metod, biyolojik ve *Agrobacterium* aracılıklı transformasyonun bir kombinasyonu olabilir.

**Compton ve ark. (1994)**, GUS'ın geçici ekspresyon metodu; kotiledonların *Agrobacterium* ile inokülasyondan hemen önce, hızlı bir şekilde 1.1 mikrometre tungsten partikül dağıtan bir PIG ile yaralandığında geliştiğini gözlemlemiştir. Biolistik metod kullanılarak yaralandığında 11 eksplantlık her kaba 400'den 1000'e kadar GUS foci tanımlandığı gözlemlenmiştir. Bu değerler; *Agrobacterium tumefaciens* ile inokülasyondan önce, bir bıçakla yaralanan aynı sayıdaki eksplantta veya kotiledonu bombardıman etmek için DNA plasmiti ile kaplanmış benzer sayıdaki tungsten parçalarından 1.6 ile 2.7 katı daha fazladır. Bununla beraber; rekombinant DNA'nın stabil entegrasyonu veya transgenik bitkilerin rejenerasyonu rapor edilmemiştir.

Bugün karpuzda en çok istenilen özellik lekeli meyveye ve daha önce belirtilen 3 karpuz virüsüne dayanıklılıktır. Karpuz lekeli meyve hastalığı, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin neden olduğu ve önemli oranda zarar yapan bir hastalıktır (**Rane ve Latin, 1992**). Hastalık ilk önce 1989'da Florida, Güney Karolina, Kuzey Karolina, Maryland, Delaware ve Hindistan'daki karpuz tarlalarında görülmüştür. Hastalık, kotiledon ve yapraklar üzerinde

aşırı sudan kaynaklanan lezyonları ve yaprakların çatlama, meyve yarılmaması ve meyve çürüme belirtilerini içermektedir. Ürün kaybının %90'ın üzerinde olduğu çiftçiler tarafından bildirilmiştir. Hastalık arazide enfekte olan bitki parçalarının sulama suyundan veya yağıştan ıslanması sonucu yayılır (**Hopkins ve ark., 1992**).

Lekeli meyve hastalığı, yeni arazilerde enfekte olmuş tohumların taşınması ile olmaktadır. Ticari yetiştiricilere şunlar tavsiye edilmiştir;

1. Lekeli meyve hastalığından elenen ve negatif olan tohum veya fidelerin kullanılması.
2. Hastalık belirtilerinin incelenmesi ve bulaşık bitkilerin yok edilmesi.
3. Hastalığı barındıran ya da kendiliğinden gelen bitkilerin atılması ve bir ölçü olarak da haftadan haftaya bakır içeren fungusid uygulaması (**Moore, 2001**).

Buna rağmen, bu kültürel ve kimyasal ölçüler hastalığın kontrol edilmesi için yeterli değildir.

Transgenik karpuzda, cecropin şifreli genlerin bitkilere aktarılması ve ekspresyonu belki lekeli meyve hastalığına dirençlilik sunabilir. Cecropin bir böcek proteini olup, antibakteriyel aktiviteye sahiptir (**Jaynes ve ark., 1987**). Birçok transgenik bitkide, dirençlilik vermekte olan birkaç cecropin mevcuttur.

**Liu ve ark. (2001)**, transgenik Royal Gala elmasının (*Malus x domestica* Borkh.) transgenik olmayanlara göre *Erwinia amylovora*'ya daha dayanıklı olduğunu rapor etmiştir. MB 39 cecropin geninin ekspresyonuyla transgenik tütün bitkileri bakteriyel hücrelerin büyümesini baskı altında tutarak *Pseudomonas syringae* pv. tabaci'ye dirençliliği geliştirdiğini göstermiştir (**Huang ve ark., 1997**).

Cecropin gen ekspresyonunu yapan transgenik patates bitkileri, *Pseudomonas solanacearum* ile enfekte olduğunda hastalık şiddeti ve ölüm oranları düşmüştür (**Destefano-Beltran ve ark., 1990**). Rekombinant genlerin ekspresyonunda bakteriyel dirençliliğin transgenik bitkilerde delil olarak sunmayı sağlamakta ve karpuzda meyve leke hastalığına dirençliliğin kazandırılmasında ümitvar görünmektedir.

Kabakta sarı mozaik virüsüne karpuzun dirençliliği birçok yabancı genotipte tanımlanmıştır (**Providenti, 1991; Boyhan ve ark., 1994**). Bu virüslere dayanıklılık veren transgenlerin tanımlanması, mevcut çeşitlerin meyve kalitesini değiştirmeksizin; virüslere yüksek seviyede dayanıklılık sağlamaktadır. Seminis Vegetable Seeds Inc.'deki araştırmacılar, **Choi ve ark. (1994)**, tarafından geliştirilen yöntemi modifiye ederek; virüse dirençli karpuz

bitkilerini geliştirmek için karnabahar mozaik virüsü 35S promoterinin kontrolü altındaki ZYMV ve WMV kabuk genlerinin ekspresyonu **Tricoli ve ark. (2002)** tarafından yapılmıştır. Sonuç olarak, transgenik ıslah hatlarının arazide her iki virüse de dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ancak, kontrol bitkilerin ve transgenik bitkilerin verim değerleri sunulmamıştır. Benzer çalışmalar; diğer kabakgillerde de yürütülmüştür. **Clough ve Hamm (1995)**, tarafından transgenik sarı crookneck (uzun) kabak (*Cucurbita pepo* var. *meloepo*) ve kavun (*Cucumis melo*) bitkilerinin iki yıl arka arkaya arazi testinde; WMP ve ZYMV kabuk protein genlerinin ekspresyonunu yapan transgenik bitkilerin hedeflenen virüslere karşı dirençliliklerinde gelişme gösterdiklerini ve transgenik olmayan kontrolden daha fazla pazarlanabilen meyve ürettiklerini rapor etmişlerdir. Viral kabuk protein sentezinin ekspresyonu, hedeflenen virüs dışında da koruma yapabilir.

**Namba ve ark. (1992)**, WMV veya ZYMV kabuk protein genlerinin ekspresyonunu yapan transgenik tütün bitkilerinin, 6 adet diğer potivirüslere (fasülye sarı mozaik virüsü, patates virüsü Y, bezelye mozaik virüsü, yonca sarı yaprak virüsü, biber benek virüsü ve tütün asit virüsü) koruma sağladığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmanın öncüleri, tek bir potivirüsün protein genlerinin ekspresyonunu yapan transgenik bitkilerin, viral enfeksiyona karşı geniş bir koruma sergilediklerini belirtmişlerdir.

Transgenik karpuz hatları birçok ticari şirket tarafından geliştirilmiş ve arazi testleri özellikle ABD'de ve Avrupa'da yapılmıştır. Transgenik ürünlerin arazi test verilerini bulmak mümkündür (**Anonymous, 2002**). Bununla beraber önemli veriler, marka bilgisi tescil edilerek sınıflandırılmış ve çiftçilerin kullanılmasına serbest bırakılmamıştır. Transgenik karpuzun tarla testlerinin büyük çoğunluğu (%80), bitkilerin virüse dayanıklılık için olup özellikle ZYMV ve WMV'nin, bitki kabuk protein genleri taşıyanlar içindir. Bunlara ek olarak, 4 kabuk protein genini (ZYMV, WMV, PRSV ve CMV'den elde edilen) taşıyan karpuz bitkileri üzerine tarla testi yürütülmüştür. Transgenik karpuz aynı zamanda partenokarpik çekirdeksiz meyve üretmek için kullanılmıştır. Transgenik bitki elde edilmesi ve tarlada test edilmesine rağmen, hiçbir transgenik karpuz ürünü henüz satışa sunulmamıştır.

#### **2.2.4.2. Hastalığa Dayanıklı Bitkilerin Elde Edilmesinde Somaklonal Varyasyonun Kullanımı**

Hastalığa dayanıklı genotiplerin üretiminde, somaklonal varyasyonun kullanılmasının potansiyel uygulaması olmasına rağmen bu alanda karpuz için doğrudan hiçbir gelişme rapor

edilmemiştir. Bununla birlikte diğer bitki türleri için başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Şeftalinin (*Prunus persica* L.) somaklonal varyantları hedef hastalıklı organizmadan hazırlanan filtre edilmiş kültürünün kullanımı, seleksiyon baskısı olsun ya da olmasın şeftali rejenerasyon besi ortamında gelişen kallustan rejenerasyon sonucu bakteriyel leke hastalığına (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*) dirençlilik göstermişlerdir (Hammerschlag, 1988; 1990). Rejenerantların bahçeye transplantasyonunu izleyen 3 yılda yüksek seviyede hastalıklara dayanıklılık gözlenmiştir (Scorza ve Hammerschlag, 1990).

Antraknozun ajanı olan *Elsinoe ampelina* (deBary) Shear'ın filtre edilerek oluşturulan %40 fungal kültürü içeren besi ortamında embriyojenik hücrelerin kültürü yoluyla antraknoza dirençli "Chandanny" üzümü (*Vitis vinifera* L.) rejenere edilmiştir (Jayasankar ve ark. 2000). Dirençli embriyolardan rejenere edilen bitkiler, sera ve arazi şartlarında dayanıklılık göstermiştir. Başka bir raporda ise Jayasankar ve Litz (1998); %60'ın üzerinde filtre edilen kültür içeren rejenerasyon ortamını mütakiben "Hindi" ve "Carabao" Mango (*Manifera indica* L)'nın embriyojenik kültürlerinin *Colletotrichum gloeosporioides* Penz ' e dayanıklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. *In vitro* seleksiyon süresince rejenere edilen bitkiler arasında fungal dayanıklılık chitinase genlerinin aktivasyonuymuş gibi görüldüğü bildirilmiştir (Jayasankar ve Litz, 1998; Jayasankar ve ark., 2000).

Karpuz meyve leke'den elde edilen kültürün filtre edilmesiyle karpuz kotiledonlarında chitinase genleri gibi, dayanıklılık genlerinin ortaya çıkmasıyla, harekete geçirebilir ve bu hastalığa dirençliliğin başarılmasında diğer patojenler kadar iyi olan, non-transgenik bir yol sunar.

Hastalıklara dayanıklılık açısından yapılan uygulamalardan bir tanesi de aşılı fide üretimidir. Yetişir (2001), karpuzda verim ve kaliteyi artırmak için yapılan aşılama çalışmalarında bir çok hastalığa dayanıklılık için kullanılan anaçlar sayesinde aşılı bitkilerden ekonomik anlamda verim alınabileceği tespit edilmiştir

### 2.2.5. Çekirdeksiz Karpuz Islahında Somaklonal Varyantların Kullanılması

Çekirdeksiz karpuz çeşitlerine tüketiciler tarafından fazla talep edilmesinin nedeni sadece çekirdeksiz olması değil (her meyvede 4 taneden daha az tohum içerir) aynı zamanda bunların diploit tohumlardan alınan ürüne göre daha tatlı olmasıdır. Çekirdeksiz karpuzlar triploit ( $3n=3x=33$ ) hibritlerdir (Kihara, 1951). Triploit tohumlar tetraploit (♀) ve diploit (♂) bitkilerin çaprazlanmasıyla elde edilir (Kihara, 1951; Andrus ve ark., 1975). Geleneksel



olarak tetraploid ebeveynler, diploid yeni fideliklerin kolşisin ile muamele edilmesiyle elde edilir (Kihara ve ark., 1951; Andrus ve ark., 1975).

Sarı (1994), karpuzda kromozom sayısının ikiye katlanmasında, yapılan çalışmada, dihaploid hatların elde edilmesi için en uygun kolşisin dozu ve uygulama süresinin ya %0.5, 4 saat veya %1, 2 saat olduğu saptanmıştır (Sarı, 1994).

Mohr (1986), tohumluk triploid melez karpuzların üretimi için izlenecek yolun triploid tohum eldesi için tetraploid hatların ana ebeveyn olarak kullanılmak zorunda olduğunu; diploid hatların tetraploid polenlerle tozlanması sonucu ise boş ve steril tohumlar meydana geleceğini vurgulamaktadır.

Lower ve Johnson (1969), Hindistan'da tetraploid karpuz hatları elde edebilmek amacıyla fidelerin büyüme noktalarına veya tohumlara kolşisin uygulaması yapmışlardır. Çalışmada Charleston Gray 133 ve Princeton çeşitlerine;

- a. Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 24 saat içinde 2 damla %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- b. Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 52 saat içinde 8 damla %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- c. Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 80 saatte %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- d. Ekimden önce tohumların 6-24 saat (6 saat aralıklarla) %0.1-%0.2 kolşisin çözeltisine daldırma işlemleri uygulanmıştır.

Araştırma sonucunda Princeton çeşidi tetraploidiye Charleston Gray 133'e göre daha iyi yanıt vermiştir. Bu çeşitte 8 damla kolşisin uygulaması (52 ve 80 saatte) %6 oranında tetraploid uyartımı sağlarken; C. Gray çeşidinde bu oran %4 düzeyinde bulunmuştur. 2 Damla (24 saatte) kolşisin uygulaması Charleston Gray çeşidinde hiç yanıt vermezken; Princeton çeşidinde %3 düzeyinde tetraploidi oluşturmuştur. Tohumların 24 saat %0.1'lik veya 18 saat %0.2'lik kolşisine bandırılması, %0-20 oranlarında tetraploidi oluşturmuştur. Araştırmacılar tohum bandırma yönteminin büyüme ucuna damlatmaya göre daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Tetraploid bitkileri belirleme kriteri olarak;

- Tetraploid bireylerin diploidlerden daha geniş ve tüylü yapraklı, iri çiçekli ve sülüklü olduğu,
- Diploidlerde çiçek tozu çapı ortalama 64 µm iken tetraploidlerde 78 µm olduğu,



- Diploid çiçek tozları %93.58 boyanma özelliği gösterirken, tetraploidlerde bu oranın %82.85 olduğu,
- Diploidler 1 adet çiçek tozu çim borusu oluştururken, tetraploidlerde en az 4 adet çim borusu gözlemlendiği ve ayrıca çiçek tozu çimlenmesinin de tetraploidlerde diploidlere göre daha düşük bulunduğu,
- Diploidlerde 45 adet kendilemeden 25'i meyve bağlarken; karşılıklı tozlamadan da yüksek meyve tutumu elde edildiği, oysa 131 adet tetraploid bitkiden hiçbirinde kendileme ile meyve alınmadığı, ayrıca 48 adet karşılıklı tozlamadan da meyve oluşturmadığı araştırmacılarca belirlenmiştir.

**Abak (1993)**, biberlerde haploid bitkilerden dihaploid bireylerin elde edilmesi için toprağa şaşırtmadan 20-30 gün sonra kolşisin uygulaması yapılabileceğini belirtmiştir. Araştırmacı bu aşamada bitkilerin büyüme ucu ile yan dallarının kesilerek kuvvetli bir budamanın yapılmasını ve yaprak koltuklarındaki aksiler tomurcuklar üzerine birer damla %0.5'lik kolşisin damlatılmasını önermekte ve damlatmanın 24 saat arayla iki kez uygulamasının yararlı olduğunu kaydetmektedir.

**Schifino ve Moraes Fernandes (1987)**, Brezilya'da *Leguminaceae* familyasından bir yem bitkisi olan üçgül (*Trifolium riograndense* Burkart) türünde poliploid bireyler elde etmek için kolşisin uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar kotiledon yaprakların yere paralel aşamada olduğu bitkiciklerde şu uygulamaları denemişlerdir:

- a) Bitkilerin 5-6 saat süreyle %0.15, 0.20 ve 0.30 konsantrasyonlarda kolşisin çözeltisine bandırılmaları,
- b) Bitki büyüme uçlarına her 3 saatte bir olmak üzere 4 kez aynı konsantrasyonlardaki kolşisin çözeltisi damlatma,
- c) Büyüme uçlarına 24 saat süreyle pamuğa emdirilmiş aynı konsantrasyonlarda kolşisin içeren birer küçük pamuk parçası yerleştirme.

Araştırma sonucunda üçgül türünde poliploidi uyartımı için en uygun yöntemin fidelerin 6 saat süreyle %0.30'luk kolşisine bandırılması olduğu bulunmuştur. Poliploid bireylerin çoğunluğunda yapraklarda 3'ten fazla yaprakçık oluşmuş; çiçek tozu çim borusu sayısı ise 3-4 adetten daha fazla bulunmuştur.

**Karchi ve ark. (1981)**, İsrail'de Sugar Baby karpuz çeşidine kotiledon aşamasındayken kolşisin uygulaması sonucu tetraploid "Alena" çeşidini geliştirmişlerdir. Sugar Baby'ye göre bu çeşidin yaprakları daha geniş ve kalın, çiçekleri daha geniş, taç

yaprakların dip kısımları renkli, tohumları daha iridir. Sugar Baby'de meyve başına birkaç yüz adet tohum mevcutken; Alena'da 70 adet civarındadır. Bitki gelişimi daha yavaş, kol sayısı daha azdır ve sülükler daha yavaş gelişmekte, verimi Sugar Baby'e oldukça yakın olup 5 ton/da civarındadır.

**Karchi ve ark. (1983)**, İsrail koşullarında tetraploid Alena ile ebeveyni Sugar Baby çeşitlerinde morfolojik gelişim ve verimlilik durumlarını incelemek üzere bir deneme yapmışlardır. Denemede, Alena'nın, Sugar Baby'den 20 gün daha sonra çiçeklendiği, çiçeklenme aşamasında bitkisinin Sugar Baby'den daha küçük olduğu; Sugar Baby'nin yarısı kadar dal oluşturduğu; boğum sayısının Sugar Baby'nin %65'i kadar olduğu, ana gövde ile yan kol uzunluklarının Sugar Baby'nin yarısı kadar olduğu saptanmıştır. Bu nedenle Alena çeşidinin uyartıcı uygulamalara ihtiyacı olduğunu belirleyen araştırmacılar fazla miktarda üst gübreleme yapmışlardır. Üst gübreleme uygulaması ile gerek meyve ağırlığı, bitki başına meyve sayısı ve verim önemli ölçüde yükselmiş ve ebeveyni Sugar Baby'e yaklaşmıştır.

Ploidi seviyesi morfolojik özellikler incelenerek daha erken tahmin edilebilir. Örneğin yaprak ve çiçek büyüklüğüne göre fidenin tetraploid ya da diploid olduğu kolayca söylenebilir. Tetraploit bitkiler genelde diploitlerden daha geniş ve büyük yapraklara ve daha iri çiçeklere sahiptir. Tohum şekli ve boyutu poliploitlerin tanımlanması için de kullanılabilir. Tetraploit tohumlar, aynı genotipteki diploit tohumlara göre genelde daha iri ve daha kalındır (**Kihara, 1951**).

Tetraploit bitkilerin sera veya arazide tanımlanması tam gelişmiş yapraklardaki bekçi hücrelerdeki kloroplastların sayılmasıyla olabilmektedir **Mccuiston ve Elmstrom, (1994)**, Yapılan çalışmalar, tetraploit bitkilerde bekçi hücreleri 16-20 arasında kloroplasta sahip olurken, diploitlerde ise bekçi hücrelerin sadece 8-16 kloroplast ürettiğini göstermiştir.

Tetraploid karpuz bitkilerinin diploid fidelerin yeterli miktardaki kolşisin çözeltisiyle muamele edilmesiyle elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Kloroplastların sayılmasıyla diploid ve tetraploid rejenerantların tanımlanabileceği kavunda **Fassuliotis ve Nelson (1992)**, patatesten **Cappadocia ve ark. (1984)** tarafından rapor edilmiştir.

**Compton ve ark (1999)**, diploid ve tetraploid bitkilerde ploidi seviyesinin tespitini, yapraklarda bekçi hücredeki kloroplastların sayımını yaparak bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada, *in vitro* diploid sürgünlerde 9.73; *in vitro* tetraploid sürgünlerde 17.16; *in vitro* diploid bitkilerde 9.37; *in vitro* tetraploid bitkilerde 17.11 olarak bulunurken diploid *in vivo*

sera bitkilerinde 11.19 ve tetraploid *in vivo* sera bitkilerinde ise 18.71 kloroplast tespit edilmiştir.

**Compton ve ark. (1994)**, diploid karpuz kotiledonlarından tetraploid bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada, yeni sürgünler, diploid Micky Lee karpuz çeşidi kotiledonlarının 6 haftalık sürgün proliferasyon ortamına aktarılmasından elde edilmiştir. Bu bitkiler 1-2 cm uzunluktaki sürgünlerin, 0.2 mg l<sup>-1</sup> IBA köklenme ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. Tetraploid ve diploid tanımlanması, rejenerantların yapraklarda bekçi hücredeki kloroplastların sayılmasıyla yapılmıştır. Yapılan çalışmada, diploid rejenerantlardaki kloroplast sayısının ortalaması 11.2, tetraploidlerde ise 18.6 olarak bulunmuştur. Tetraploidlerde kloroplast sayısı, diploidlerden 1.7 kat daha fazla olduğu belirtilmiş ve bitkilerde ploidi seviyesinin yapraklardaki bekçi hücredeki kloroplastların sayılmasıyla tespit edilebileceğini bildirmişlerdir (**Andrus ve ark., 1971; Kihara 1951**).

**Compton ve ark. (1996)**, *in vitro* diploid karpuz kotiledonlarından elde edilen tetraploid rejenerantların tanımlanmasında, ploidi seviyesinin tespit edilmesiyle birlikte yaprak ve çiçeklerde ölçümler yapılmıştır. Çalışmada, ploidi seviyesinin tespit edilmesinde bekçi hücrelerindeki kloroplastların sayılmasıyla da mümkün olduğunu ve tetraploid rejenerantlarda kloroplast sayısı ortalaması; 19.1 iken, diploidlerde ise 11.2 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca tetraploid oluşumun belirlenmesinde, ovaryum çapı ve boyu, petal ve anter çapının, yaprak uzunluğu ve genişliğinin iyi bir işaret ve kriter olacağını bildirmişlerdir. Tetraploid bitkilerde yaprak uzunluğu, diploid bitkilere göre daha kısa, yaprak genişliğinin ise tetraploidlerin diploidlere göre daha geniş olduğu belirtilmiştir. Diploid Jubile II çeşidinde, yaprak uzunluğu; 14.11 cm, yaprak genişliği ise 12.10 cm iken aynı çeşidin tetraploid bitkilerdeki yaprak uzunluğu, 12.48 cm, yaprak genişliği ise 12.64 olarak ölçülmüştür.

Arazide morfolojik özelliklerin, hızlı bir metot olmasına rağmen, genetik değişiklikle beraber tohum ve bitki morfolojik özelliklerinin kullanılması, kök uçlarında kromozom sayısı veya kloroplast sayımına göre az güvenilirdir (**Gray ve Elmstrom, 1991; Mccuiston ve Elmstrom, 1993; Compton ve ark., 1996**). Ayrıca, flow sitometre de, karpuzda ploidi seviyesini tespit etmek için kullanılmıştır (**Zhang ve ark., 1994b**). **Brown ve ark. (1991)**, ploidi analizinde kullanılan farklı teknikleri karşılaştırmışlar ve “flow sitometri” nin en etkili yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. **Gürsöz ve ark. (1991)** ve **Sarı ve ark. (1994a)** flow sitometri yönteminin, karpuz bitkisinde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

**Brown ve ark. (1991)**, *in vitro* ginogenesis yoluyla elde edilmiş olan haploid şeker pancarı bitkilerinin stomalarında kloroplast sayımı yapmışlar ve bunu tanık diploid bitkileri ile karşılaştırmışlardır. Haploid bitkilerin ( $n=x=9$ ) stomalarında ortalama 9 adet kloroplast sayılırken diploid bitkilerde ( $2n=2x=18$ ) 16 adet kloroplast bulunmuştur. Araştırmacılar şeker pancarı türünde kloroplast sayısının erken aşamada ploidi düzeyini belirlemede iyi bir kriter olduğunu belirtmektedirler.

Kendine tozlanmanın meydana gelmesi, tetraploit bitki üzerindeki erkek çiçeklerden elde edilen polenlerle aynı bitki üzerindeki dişi çiçeklerin tozlaşması sağlanarak yapılır. Hasattan 1 yıl sonra çabuk çimlenen tohumlar üretilmekte ve bunların plooidileri daha önce bahsedilen metodlardan biri kullanılarak teyit edilebilir. Mevcut tetraploit tohumların devamlılığını geliştirmek için kendine tozlaşmayı tekrar sürdürmek gerekir. Çünkü tetraploitler düşük verimlilik göstermekte (İlk tetraploit generasyonlar meyve başına sadece 4-10 tohum vermekte) (**Lower ve Jahnsen, 1969**), ve bitki başına sınırlı sayıda meyve vermekte (bitki başına tohumlu 3-4 adet meyve), bu yüzden ticari miktarda yeni triploit tohum üretmek için 10 yıl kadar bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun nedeni dar bir germplasm temelinde sonuçlanan; yetiştiriciler için riskli bir üretim ürünü olarak duran ve tetraploit ıslah hatlarının üretimi ile ilgili zorluktan dolayı triploit hibritler için tetraploit ebeveynler arasında farklılık sınırlıdır ve bundan dolayı triploit hibritlerin üretiminde kullanmak için sadece birkaç tetraploit ıslah hattı kullanılmıştır.

**Sugiyama (2000)**, kolşisin uygulamasından farklı olarak, çekirdeksiz karpuz elde etmede uygulanan yöntemlerden, X-Ray polen ışınlamasının etkili bir yöntem olduğu tespit etmiştir.

**Gürsüz ve ark. (1991)**, tarafından karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf ) ışınlanmış polenlerle haploid bitki eldesi üzerindeki ilk çalışma yapılmıştır. Işın kaynağı olarak gama ışınının Co60 kaynağının, ışın dozu olarak 300 Gy'ın kullanıldığı araştırmada, biri melez (Panonia F1), üçü açık tozlanan (Sugar Baby, Halep Karası, Crimson Sweet ) olmak üzere 4 çeşit ana ebeveyn olarak kullanılmıştır. Işınlanmış polen olarak da bu 4 çeşidin polen karışımları kullanılmıştır. Araştırma sonucunda toplam 13 844 tohumdan 761 adet embriyo elde edilmiş ve bu embriyolardan %72'si globüler, %28'i yürek şeklinde (%8'i yumuşak, %19'u nekrotik ve %1'i normal) bulunmuştur. Bu embriyolardan Panonia F1'de 6'sı, Sugar Baby ve Halep Karası'nda 5'i, Crimson Sweet'te ise 1 adedi bitkiye dönüşmüş ve toplam 16 adet bitki elde edilmiştir. Mayıs-13 Haziran tarihleri arasındaki tozlama dönemi

uygun bulunmuş ve normal yürek şekilli embriyolar bu dönemden elde edilmiştir. Gerçekleştirilen sitometrik analizler sonucunda bu bitkilerin tamamının haploid olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda ana hatlarıyla açıklanan soruna çözüm bulmak için, triploit tohum üretiminde kullanılmak üzere, verimliliği yüksek tetraploit bitkilerin üretiminde daha güvenilir bir metotla tetraploit ıslah hatlarında genetik farklılığın geliştirilmesidir.

Doku kültüründen poliploid rejenerantları üretimi birçok bitki türü için rapor edilmiştir (Veilleux ve Johnson, 1998) ve çok sayıda yeni tetraploit karpuz hatlarının oluşturulmasında potansiyel uygulamalara sahiptir. Diğer bitkilerde olduğu kadar adventif sürgün rejenerasyonundan elde edilen karpuz rejenerantları arasında poliploidi yaygındır (Zhang ve ark., 1994; Compton ve ark., 1986). Örneğin 5 farklı diploit çeşidin kotiledon eksplantlarından rejenere edilen sürgünlerin %5-20'si tetraploittir. Bundan dolayı bu metodun tüm diploit karpuz çeşitlerinde uygulanabilmesi mümkündür. Meristemleri kolşisinle muamele etmekten farklı olarak, doku kültürü rejenerantlarının yüksek bir oranı (%90) nonkimerik olup tetraploidlerdir (Compton ve ark., 1996; Jaworski ve Compton, 1997).

Maestro-Tejada (1992), haploid kavun bitkiciklerine *in vitro*'da 2 saat süreyle %0.5 kolşisin uygulaması yapmıştır. Kolşisinin toksik etkisini incelemek üzere uygulamayı 1 yaprak ve koltuk gözü içeren bireysel mikroçeliklere ya da 7-8 boğum taşıyan tüm bitkilere yapan araştırmacı; bireysel uygulamada çeliklerin %31'inin yaşadığını; tüm bitki uygulamalarında ise toksik etkinin daha az olduğunu ve bitkilerin %65'inin yaşadığını saptamıştır. Araştırmacı kavun türünde genel olarak 2 saat süreyle %0.5 kolşisin uygulaması ile bitkiciklerin %45'inin yaşadığı ve yeni bitkilerin %10'unun katlanarak diploid olduğunu belirtmektedir.

Tetraploid bitkiler, kendilerinin benzeri olan diploidlerle kıyaslandığında genellikle daha düşük verimliliğe sahiptirler. Bu durum özellikle kendilemenin ilk 5 generasyonunda görülür. Yeterli miktarda triploid hibrit tohumlarının üretiminde kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan miktardaki tetraploid tohum üretiminde zorluk çekilmektedir (Kihara, 1958; Compton ve Gray, 1992; M. Cuistion ve Elmostrom, 1993; Compton ve ark., 1993a).

Dore (1976), kuşkonmaz (*Asparagus officinalis* L.) türünde elde edilmiş olan haploid bitkilerde kromozom katlaması yapmıştır. Araştırmacı, *in vitro* besi ortamına kattığı farklı kolşisin dozlarında ( $5 \cdot 10^{-5}$  ve  $1 \cdot 10^{-4}$ ) haploid meristemleri farklı sürelerde (1, 2, 3, 4, 5 ve 6 gün) tutmuş ve bu süreler sonunda meristemleri normal besi ortamına alarak büyütüştür. 2



aylık bir büyütme periyodu sonunda toprağa aktarılan bitkiciklerde kromozom sayımı yapılmış ve katlama işleminin genotipten çok etkilendiği görülmüştür.  $5 \cdot 10^{-5}$  dozunda kolşisin katılarak 1 gün, 2 gün, 3 gün ve 6 gün ;  $1 \cdot 10^{-4}$  dozunda kolşisin katılarak 1 gün, 3 gün ve 6 gün süreyle bu ortamda bekletilen meristemlerden oluşan bitkilerde kromozomların katlandığı belirlenmiştir.

Doku kültüründen elde edilen tetraploit rejenerantlar aynı genotipteki diploit çeşitle karşılaştırıldığında düşük verimlilik gösterir. Fakat kolşisinle muamele edilerek elde edilen tetraploide göre daha verimlidir.

Yukarıda belirtilen metodlar kullanılarak doku kültüründen elde edilen materyalin tetraploit olduğu gösterilebilir. Bununla birlikte, daha önce belirtilen tüm metodlarda, rejenerantlar önemli bir zaman periyodunda (İlk kültürden itibaren 16-20 hafta) aklimitize olmaya ve serada yetiştirmeye ihtiyaç duyarlar. Eğer sürgünler kültürdeyken ploidileri tesbit edilebilirse bu tetraploit tohumların üretimi için avantajlı ve yararlı olur. Bu düşünceyle, rejenerant karpuz sürgünlerinin ploidilerini tesbit etmek için, fluorescent diacetate (CFDA)'nın kullanıldığı bir teknik **Compton ve ark. (1990)**, tarafından, patates (*Solanum phureja* Juz ve Buk.), **Singsit ve Veilleux (1991)**, ve yerfıstığı (*Arachis* sp.) (**Singsit ve Ozias-Akins, 1992**) için geliştirilen tekniklerden adapte edilmiştir.

Bu teknikte, rejenerant sürgünlerden kesilen yapraklar mikroskobun tablasına yerleştirilir ve alttaki epidermis %0.01 FDA ile boyanır. İşleme sokulan yapraklar 5 dakika karanlıkta bekletilerek boyayı absorbe etmesi sağlanır. Daha sonra bekçi hücre kloroplastları epifluorescent aydınlatıcı ve fluorescence isothiocyante filtre ile kombinasyonlu 400 büyütmeli bir mikroskopta incelenir. Muamele edilen yaprakların kloroplastları yeşil renkte görülür ve kolayca farkedilir. İncelenen tetraploit sürgünlerin %100 gibi yüksek bir doğruluk derecesi ile non-kimerik ve gerçek tetraploid olduğu ispatlanmıştır.

Triploit hibritler, tetraploit rejenerantların ebeveyn olarak kullanılmasıyla elde edilmiştir (**Compton ve ark., 1993**). Meyve üretimi ve kalitesi değerlendirilmiş ve 2 ticari triploit çeşitle ( Tri-X-313 ve King of Hearts) mukayese edilmiştir. Meyve sayısı bakımından *in vitro* tetraploitlerin sayıları Tri-X-313'den fazla ve King of Hearts'e benzer bulunmuştur. Meyve kalitesine, fizyolojik düzensiz hallow heart'ın oluşumuna göre karar verilmiştir. Tüm *in vitro* triploit hibrit döller King of Hearts ile karşılaştırıldığında yüksek, Tri-X-313 çeşidi ile benzer meyve kalitesi göstermişlerdir. Bununla birlikte *in vitro* triploit hibritlerden biri Tri-X-313 çeşidinden daha büyük bir hallow heart değerine sahiptir.



Bugüne kadarki çalışmalar; diploit çeşitlerden verimli kimerik olmayan tetraploitlerin üretilebileceğini göstermiştir. Doku kültüründen rejenere edilen tetraploitlerin, fidelere kolşisin uygulayarak elde edilenlere göre verimliliğinin daha gelişmiş olduğu görülmektedir. *In vitro* elde edilen triploit hibritler, üreticiye direkt verilebilen triploit hibritlerle karşılaştırıldığında eşit veya daha yüksek kalitede meyve üretmektedir.

**Sarı ve ark. (1994a)**; karpuzda genotipin haploid embriyo uyartımı üzerine etkilerini incelemiştir. Araştırmada Panonia F1, Sugar Baby, Halep Karası ve Crimson Sweet çeşitleri, 4 çeşide ait karışık ve 300 Gy gama ışınıyla ışınlanmış polenleri ile tozlanmıştır. Tozlamadan elde edilen 26 adet meyveden toplam 13 844 adet tohum açılmıştır. 100 tohumdaki embriyo sayısı bakımından Halep Karası çeşidi (% 14.2), Crimson Sweet (% 4.0), Panonia (% 4.0) ve Sugar Baby (%3.6)'ye göre daha yüksek performans göstermiştir. Yürek şeklindeki embriyo oranı Panonia'da 2.4, Crimson Sweet'te % 1.4, Halep Karası ve Sugar Baby'de 0.0 olarak bulunmuştur. Tozlamadan 2, 3, 4 ve 5 hafta sonra koparılan meyvelerdeki embriyolar incelenmiş ve 2. haftanın çok erken olduğu, elde edilen embriyoların çoğunun henüz globüler veya yumuşak yürek şekilli aşamada buldukları belirlenmiştir. Tohum ekstraksiyonu için meyvelerin tozlamadan 3-4 hafta sonra koparılmasının uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

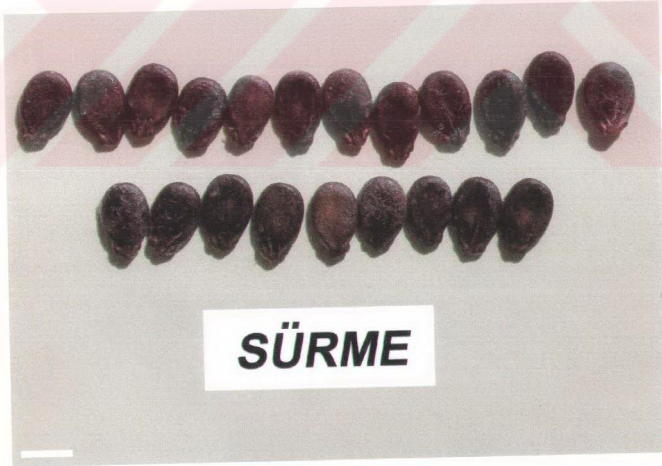
#### 3.1. Materyal

Bu araştırma, Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ait Biyoteknoloji Laboratuvarında, 2001-2003 yılları arasında yürütülmüştür. Araştırmada, materyal olarak Diyarbakır'da yoğun üretimi yapılan "Sürme" çeşidine ait karpuz tohumları kullanılmıştır. Tohumlar, Diyarbakır karpuzunun yoğun olarak üretildiği yerlerden biri olan ve Karpuz Festivallerinde iri karpuzlarıyla birincilik ödülünü sürekli kazanan, merkeze bağlı "Erimli" köyünden temin edilmiştir.

#### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri

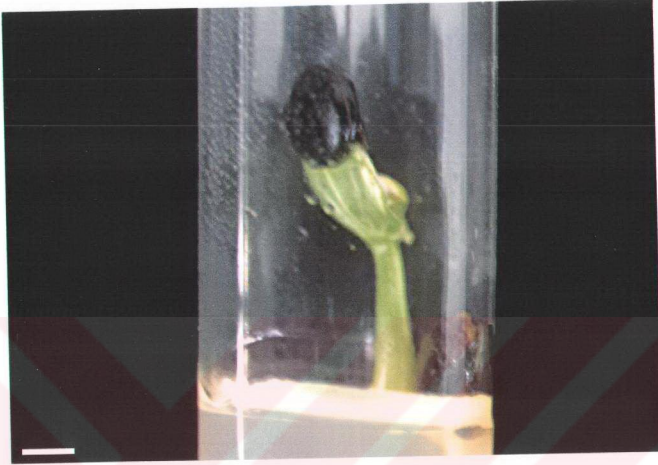
Yukarıda belirtildiği gibi eksplant olarak Diyarbakır Karpuzu "Sürme" çeşidinin tohumları ana materyal olarak kullanılmıştır. *In vitro* çalışmalarda kullanılan materyal tipleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

**Tohum:** Akseni kotiledon elde etmek için tohumlar yöntem kısmında da anlatılacağı gibi sterilize edildikten sonra hormonsuz MS besisi ortamında çimlendirilip, sürgün proliferasyon çalışmalarında ana eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (**Resim 4**).



**Resim 4.** Çalışmada Kullanılan "Sürme" Çeşidine Ait Tohumları Genel Görünümü (bar: 6.61 mm).

**Kotiledon:** *In vitro*'da çimlenen tohumların 5 günlük kotiledonlarıdır. Tüm *in vitro* sürgün proliferasyonu çalışmalarında sürgünler bu kotiledonlardan elde edilmiştir (**Resim 5**).



**Resim 5.** *Hormonsuz MS Besi Ortamında Çimlendirilmiş Kotiledonlar*  
(bar: 3.6 mm).

**Bahçeden alınan sürgün uçları:** Sürgün proliferasyonuna eksplant tipinin etkisini test etmek için arazide yetiştirilen “Sürme” çeşidine ait bitkilerden alınan sürgün uçları, bölüm 3.3.1.3'te anlatıldığı gibi sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

***In vitro* apikal ve nodal sürgünler:** Eksplant tipinin *in vitro*'da köklenmeye etkisini belirlemek için sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilen rejenerantlardır.

### 3.1.1.1. Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Eksplant Tipleri

***In vitro* sürgün yaprakları:** Sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilen rejenerantlardaki yapraklar olup beğçi hücredeki kloroplast sayısı için kullanılmıştır.

***In vivo* yapraklar:** Bekçi hücredeki kloroplast sayısı için büyüme odasında yetiştirilen bitkilerden ve arazide tohumdan oluşan bitki yapraklarıdır.

***In vivo* kolşisinli yapraklar:** Tarlada tohumdan yetiştirilen ve kolşisin uygulanan bitkilerden elde edilen yapraklar olup beğçi hücredeki kloroplast sayısı için kullanılmıştır.

### 3.2.Yöntem

#### 3.2.1. Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

##### 3.2.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda besi ortamı olarak **Murashige ve Skoog, (1962)** tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda MS besi ortamının 7 gl<sup>-1</sup> agar ile desteklenmiş katı hali kullanılmıştır. Organojenez çalışmaları için MS besi ortamında kullanılan karbonhidrat ve bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve stok çözeltilerin hazırlanmasıyla ilgili bilgiler aşağıda belirtilmiştir:

#### MS (makro elementler) Ana Solüsyonu

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g
KNO <sub>3</sub>	19.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g
Distile Su	1000 cc.'ye tamamlanır.

#### MS mikro 1 Elementler Ana Solüsyonu

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2230 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860 mg
KI	83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25 mg
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

#### MS Mikro 2 Elementler Ana Solüsyonu

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25 mg
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	25 mg
Distile su	100 cc.'ye tamamlanır.

#### Komplex Kelatör Ana Solüsyonu

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.78 g
--------------------------------------	--------

Na <sub>2</sub> EDTA	2.00 g
Distile Su	1000 cc'ye tamamlanır.

**Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu**

Nikotink Asit	50 mg
Glisin	2.00 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**B<sub>1</sub> Vitamini Ana Solüsyonu**

Tiamin HCl	100 mg
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**BAP (6-Benzylaminopurin) Ana Solüsyonu**

BAP	100 mg
1N HCl	2-3 cc.
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**NAA ( $\alpha$  Naftalenasetik asit) Ana Solüsyonu**

NAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc.
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**IAA (İndolasetikasit) Ana Solüsyonu**

IAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	5-10 cc.
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**IBA (3-İndolbutirik asit) Ana Solüsyonu**

IBA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc.
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) Ana Solüsyonu**

2,4-D	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	100 cc'ye tamamlanır.

**Kinetin ana solüsyonu**

Kinetin	100 mg
Distile Su	100 cc'ye tamamlanır.

**Çizelge 2. Murashige ve Skoog Besi Ortam İçeriği (gl<sup>-1</sup>)**

Agar	7 g
Sakkaroz	30 g
MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc
Komplex kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
B <sub>1</sub> vitamini ana solüsyonu	1 cc
Distile su	1000cc.'ye tamamlanır.

Besleyici elemanların ve büyüme düzenleyicilerinin seçimi türlerin başarılı bir şekilde kültüre alınması için son derece önemli bir faktördür.

Kullanılan tüm maddeler mg l<sup>-1</sup> ve/veya (w/v) ağırlık/hacim ile ifade edildi. Bir litrelik standart MS besi ortamı hazırlamak için 1 litrelik bir erlenmayer içerisine 250 ml steril distile su bırakıldı. Daha sonra sakkaroz belirtilen konsantrasyonda eklendi. Bu işlemi sırasıyla; çizelge 3.2.1.1.1'de verilen MS ana solüsyonu (100 cc.), MS mikroelementler-1 (10 cc), MS mikroelementler-2 (1 cc.), Kompleks kelatör (10 cc.), Vitamin karışımı (1 cc.) ve B<sub>1</sub> vitamini ana solüsyonu (1 cc.) elemanlarının belirtilen konsantrasyonlarda erlenmayer içine aktarılması izledi. Her madde ekleniminden sonra çökelmeyi önlemek amacıyla hazırlanan solüsyon birkaç dakika çalkalandı. Ortam için gerekli olan bu elemanların eklenmelerinden sonra, tüm bu karışım steril distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Daha sonra besi yerleri 250 ya da 500 ml'lik



erlenmayerlere aktarıldı. Bitki büyüme maddeleri (oksinler ve sitokininler) eklendikten sonra pH, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile, 5.7 ya da 5.8'e ayarlandı. Ortamın katılaştırılması için agar eklendi. Besi ortamının sterilizasyonu, 1 atmosfer basınçta 121°C' de 25 dakika süre ile yada besi ortamının miktarına göre bu süre azaltılarak ya da artırılarak otoklavda bekletilmek süreti ile yapıldı. Sterilizasyonu yapılan besi ortamı, röpikaj odasında steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kaplarına bölüştürüldü (50-60 cc). Besi ortamı soğuduktan sonra eksplantlar inoküle edildi. Kapakları 2 kat parafilmle sarılan kültür kapları daha sonra büyüme odasına aktarıldı.

### 3.2.1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) stok çözeltilerinin hazırlanması için büyüme maddelerinin ihtiyaç duyulan miktarları bir parça folyo içinde tartıldı. Stok çözeltiler genelde mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Tartımdan sonra 50 ya da 100 ml temiz balon jodelere aktarıldı. Her madde az miktarlarda 5-10 ml 1 M KOH, (TDZ, IPA, NAA, Picloram, NOA, ABA için), ya da 5-10 ml HCl (BAP, K, Zea, TDZ ve 2iP için) içinde küçük magnetik karıştırıcılarla birlikte çözdürüldü. Bazı maddeler ise (IBA, 2,4-D, 2,4,5-T) alkolde eritildi. Eritilen BBD steril saf suyla, 50 ya da 100 ml'ye tamamlandı. Her madde eklemenden sonra küçük elektromagnetik karıştırıcı yardımıyla çözelti homojen bir şekilde karıştırıldı.

Bazı hormonlar (IAA, ABA ve IBA) sıcakta bozulacağı için filtre ile sterilize edildikten sonra besi ortamına ilave edildiler.

Büyüme maddeleri stok çözeltileri 4°C'de buzdolabında saklandı ve rutin olarak her üç haftada bir taze solüsyonlar hazırlandı.

### 3.2.1.3. Sterilizasyon Teknikleri

Tüm bitkiler gibi karpuz tohumlarının mantar kökenli ve bakteri kökenli enfeksiyonunu engellemek ve kontaminasyondan kaçınmak için mikropropagasyon işlemlerinde kullanılacak eksplantların yanısıra besi ortamı, kullanılan aletler ve kültür kaplarının da tamamen steril (mikropsuz) şartlar altında kullanılması son derece önemlidir.

Bu nedenle sterilize edilecek eksplantlar için, en iyi yüzey sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir. Bununla beraber, bu metod tüm bu mikroorganizmaları uzaklaştıracak, bitki sistemine zarar vermeyecek yukarıdaki yöntemlere uygun bir metod olmalıdır.

Tüm *in vitro* çalışmalar esnasında izlenen sterilizasyon yöntemleri aşağıda tanımlanmıştır.

#### 3.2.1.4. Isı ile Sterilizasyon

Aşağıdaki maddelerde belirtilen materyaller iki katlı alüminyum folyo içine sarıldı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika 1 atmosferlik basınç altında sterilize edildi.

1. Distile su içeren erlenmayerler (kaplar).
2. Besi ortamı içeren erlenmayerler (ısıda bozulan elemanlar eksik şekilde).
3. Pensler, bistüriler ve 10-11 numara cerrahi bistüriler.
4. Plastik doku kültür kapları.

#### 3.2.1.5. Filtrasyon ile Sterilizasyon

IAA, IBA, Zea, ABA, GA<sub>3</sub> ve peroksidaz gibi sıcakta bozulan bileşiklerin sterilizasyonu için mikro filtrasyon kullanılır. Belirtilen bileşiklerden çalışmamız boyunca yalnızca IBA kullanılmıştır. IBA'nın sterilizasyonu içinde çalışma boyunca Steril Acrodisc (0,2 µm) mikro filtre kullanıldı.

#### 3.2.1.6. Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pamuklar 2 kat ambalaj kağıdına sarılıp, etüvde 180°C'de iki saat süreyle sterilizasyona tabi tutuldu. Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bistürilerin muhafazası ve bitki parçalarının kesilmesi amacı ile iki ayrı ebatla kullanılan filtre kağıtları, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

#### 3.2.1.7. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler (tüp, petri kutusu, erlen, mezür, balon joje, pipet, beher) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile iyice temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde bir saat bekletilmek suretiyle kurutuldu. Tamamen kurumuş olan tüplerin ağzı steril pamuklar ile kapatıldı. Daha sonra ambalaj kağıtları ile iki kat sarılıp etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

Kullanılan Magenta GA-7 kültür kapları ise, alüminyum folyo ile sarılarak 121 °C'de ve 1 atmosfer basınçta 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi.

### 3.2.1.8. Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pens ve bistüriler, önce %96'lık etil alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 300° C' lik bir kuru sterilizatörde 30 dakika süre ile sterilize edildi.

### 3.2.1.9. Röpikaj Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Röpikaj odası; tüm *in vitro* çalışmalarda eksplantın sterilizasyonunun ve steril kabin içerisinde inkübasyon işlemlerinin uygulandığı aseptik bir ortamdır.

Röpikaj odasında, bir ultraviyole lambası, içinde ekim işlemlerinin gerçekleştirileceği steril bir kabin ve kabin içerisinde bunzen beki bulunmaktadır. Röpikaj odasına girilmeden 24 saat önce, kapı, duvar, masa, dolaplar taban vs. seyreltilmiş sodyum hipoklorit (%53 NaOCl) veya kalsiyum hipoklorit (CaOCI) ile steril edilir. Steril kabinin içi ve dış yüzeyi ise alkol (%96'lık) ile temizlenir. Ultraviyole lambası, oda temizlendikten sonra ekim işlemlerinden bir gece önce 2 – 4 saat açık bırakılarak, odanın sterilizasyonu tamamlanmış olur.

Tüm işlemler, standart sterilizasyon yöntemleri izlenerek steril bir oda içinde ve steril kabin içinde gerçekleştirilir. Kullanımdan önce % 96'lık alkol içinde steril edilen cerrahi Triflex eldivenleri giyilir. Manipulasyon sırasında düzenli olarak, ayrıca istemeden steril olmayan maddelere dokunulduktan sonra, eller % 96'lık alkol ile steril edilir. Çalışma süresince yüz maskesi ve bone kullanılır ve çalışmadan önce tüm çalışma yüzeyi birkaç damla Teepol solüsyonu ve teknik alkol içeren steril mendil ile silinir. Otoklavdan çıkarılan ve besi ortamı içeren steril erlenmayerler, alkolle silinerek hızlı bir şekilde steril kabine yerleştirilir. Besi ortamının bir müddet soğuması beklenir ve daha sonra kültür kaplarına veya test tüplerine bölüştürülür. Steril kabin içerisinde yapılan ekim işlemleri süresince bunzen beki açık tutulur. Tüm organojenez çalışmalarında eksplantlar için 50 ml katı besi ortamı içeren Magenta GA 7 kültür kapları kullanıldı. Köklendirme çalışmaları için sürgünler ya 15 ml katı besi ortam içeren 100 x 12 mm test tüpleri (teknik cam) içinde ya da Magenta GA-7 kültür kaplarına aktarıldı.

### 3.2.1.10. Kültür Şartları (Büyüme Odası)

Kültürler genellikle 25±2°C'de 40 µm m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> yoğunluklu fotoperiyot, bir zaman ayarlayıcısı ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak biçimde düzenlenmiş ve ışık kaynağı olarak 3000-5000'lük ışık şiddetine sahip civalı Floresan lambalar (400 w, MBFR/U,

Thorn) kullanılarak büyüme odası hazırlanır. Bu ortamda kültürlerin gelişmesi için gerekli koşullar sağlanmış olunur.

### 3.2.1.11. Değerlendirme

Bu bölümde genel olarak yöntemler tanımlanmış ve tekrarı önlemek için çalışmalar, kısa ve ana başlıklar halinde sunulmuştur.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm araştırmalar; 5 ana başlık altında yürütülmüş olup incelenen özellikler ve yöntemler şöyle sıralanmaktadır;

1. Sterilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi çalışmaları,
2. Kültür koşullarının optimizasyon çalışmaları,
3. Sürgün proliferasyonu çalışmaları,
4. Rejenerantları köklendirme çalışmaları,
5. Aklimatizasyon,
6. Tetraploid oluşturulması,
7. Sitolojik çalışmalar; kromozom sayımı ve bekçi hücre sayımı,

### 3.2.2. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Tohumlar ve diğer materyallerle ilgili tüm sterilizasyon çalışmalarında, sterilant olarak %53'lük dolgu maddesi içeren Axion marka ticari NaOCl kullanılmıştır. Tohumun sterilizasyon çalışmalarında standart MS besi ortamı (30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz + 7 g l<sup>-1</sup> agar) hormonsuz olarak kullanılmıştır. Çalışmalarda genellikle test tüpleri, bazende Magenta GA-7 kültür kapları kullanılmış olup tüm sterilizasyon işlemleri steril olarak hazırlanmış röpikaj odasında yapılmıştır. Çalışmalarda her seri için en az 20 eksplant kullanılmış ve her deney en az iki defa tekrarlanmıştır. Tohumların, kültüre alınma işlemleri steril kabin içerisinde yapılmıştır.

Tüm sterilizasyon çalışmalarında en az 20 eksplantta aşağıdaki ölçüm ve gözlemler yapılmıştır:

**Enfekte olan kültür (%);** kültürlerin gelişmeleri dikkate alınarak 21günlük kültür sonunda, enfekte olan kültür sayısının tüm kültürlere oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

**Çimlenen kültür (%);** 21 günlük kültür sonunda, çimlenen kültür sayısının tüm kültürlere oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

**Gelişen kültür (%);** kültürün 21. gününe kadar enfekte olmadan gelişen kültür sayısının, tüm kültürlerle oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

**Enfekte olmayan kültür (%);** kültürün 21. gününe kadar enfekte olmayan kültür sayısının tüm kültür sayısına oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

### **3.2.2.1. Olgun Tohumların Sterilizasyonu**

#### **3.2.2.1.1. Kabukları Çatlatılmamış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi**

Deneyde, materyal olarak Sürme çeşidinin olgun tohumları kullanılmıştır. Bu deneyde NaOCl'ün değişik konsantrasyonları (%1, %3, %5, %10, %15 ve %20); "Sürme" çeşidinin tohumlarının aksenik çimlendirilmesi ve dekontaminasyonuna etkisini test etmek için kullanılmıştır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan önce 1-3 dakika musluk suyunda yıkanarak 30 saniye %70'lik etil alkolde çalkalanarak ön sterilizasyon yapılmıştır. Alkolden çıkarılan tohumlar, NaOCl'inin %1, %3, %5, %10, %15 ve %20 oranlarında hazırlanan çözeltilisinde 5 dakika çalkalanarak bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar daha sonra 5 kez 5'er dakika steril distile suda çalkalanarak NaOCl'ten arındırılmıştır. Tohumlar steril kabin içerisinde kurutma kağıtları üzerinde kurutularak hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu ile birlikte MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

#### **3.2.2.1. 2. Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi**

Bu deneyde NaOCl'inin değişik konsantrasyonlarının (%1, %2, %3, %5 ve 10) Diyarbakır karpuzu Sürme çeşidinin kabukları çatlatılmış karpuz tohumlarının aksenik çimlendirilmesi ve dekontaminasyonuna etkisini test etmek için kullanılmıştır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan önce 1-3 dakika musluk suyunda yıkanarak 30 saniye %70'lik etil alkolde çalkalanarak ön sterilizasyon yapılmıştır. Alkolden çıkarılan tohumlar, NaOCl'inin %1, %2, %3, %5 ve %10 oranlarında hazırlanan 100 ml çözeltilisinde 5 dakika çalkalanarak bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlarda sterilantın etkisini gidermek için daha sonra 5 kez 5'er dakika steril distile suda çalkalanarak NaOCl'ten arındırılmıştır. Tohumlar steril kabin içerisinde kurutma kağıtları üzerinde kurutularak hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu ile birlikte MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

### 3.2.2.1.3. Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna %3'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde bir önceki deneyden elde edilen sonuca bağlı kalınarak kabukları çatlatılmış karpuz tohumlarının *in vitro* yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'in en uygun konsantrasyonunda tohumların bekletme süresini tespit etmek için yapılmıştır. Kabukları çatlatılmış karpuz tohumları, %3'lük NaOCl çözeltisinde 1, 2, 4, 5, 10, 15 ve 20 dakika bekletilmiştir. Her seri için 100 ml'lik çözelti hazırlanmıştır. Sterilizasyon işlemleri ve materyalin kültüre alınma işlemleri kontrol grubu ile birlikte, bir önceki deneyde anlatıldığı gibi uygulanmıştır.

### 3.2.2.1.4. Taze Tohumların Sterilizasyonu

Taze meyvenin bulunduğu mevsimlerde direkt meyveden alınan karpuz tohumlarının yüzey sterilizasyonu için daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlardan yararlanılarak yürütülmüştür. Bir önceki deneyde, %3 NaOCl + 5 dakikalık uygulama, dikkate alınarak meyveden çıkarılan olgun tohumların sterilizasyonunda modifiye edilerek kullanılmıştır. Röpikaj odasında meyvenin dış yüzeyi önce su daha sonra alkolle temizlendikten sonra steril pens ve bistüri yardımı ile kesilerek çıkarılan tohumlara farklı işlemler uygulanmıştır. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Meyveden çıkarılan tohumlar, hiçbir işleme tabi tutmadan direkt besi ortamına aktarılmıştır (kontrol grubu olarak).
2. Meyveden çıkarılan tohumlar sadece steril distile suda 5 dakika çalkalanıp kurutulduktan sonra besi ortamına aktarılmıştır (SS).
3. Meyveden çıkarılan tohumlar steril distile suda çalkalanıp pens ve bistüri yardımı ile kabukları çatlatılıp kurutulduktan sonra besi ortamına aktarılmıştır (SSÇ).
4. Meyveden çıkarılan tohumlar, %3'lük NaOCl'te 5 dakika bekletilip steril distile suda 5 kez çalkalanıp kurutulduktan sonra besi ortamına (kabuklu) aktarılmıştır (%3+SS).
5. Meyveden çıkarılan tohumlar %3'lük NaOCl'te tabi 5 dakika bekletilip steril distile suda 5 kez çalkalanıp kurutulduktan sonra besi ortamına (kabuksuz) aktarılmıştır (%3+SSK).



6. Meyveden çıkarılan tohumlar %3'lük NaOCl'te 5 dakika bekletildikten sonra steril distile suda 5 kez çalkalanıp kurutulduktan sonra besi ortamına kabukları çatlatılıp aktarılmıştır (%3+SSÇ).

### **3.2.2.2. Serada Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu**

#### **3.2.2.2.1. Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi**

Serada saksılarda yetiştirilen karpuz fidelerinden elde edilen bitkisel eksplantların yüzey sterilizasyonu için NaOCl'ün %1, %2, %3 ve %4'lük konsantrasyonlarının 2 dakikalık immersiyon süreleri uygulanmıştır. Seradan getirilen eksplantlar; 1.5 – 2 cm kesilerek 3-5 dakika musluk suyunda yıkanarak %70'lik alkolde 30 saniye çalkalanmıştır. Daha sonra eksplantlar yüzey sterilizasyonu için NaOCl'ün, %1, %2, %3 ve %4'lük konsantrasyonlarında 2 dakika bekletilmiş ve sterilantın etkisini gidermek için steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak NaOCl'ten arındırılmıştır. Steril kurutma kağıtları arasında steril pens ve bistüri yardımıyla materyalin NaOCl'ten zarar görmüş kısmı kesilerek Magenta GA-7 kültür kaplarına her birinde 3'er eksplant olacak şekilde aktarılmıştır. Bu deneyde kullanılan MS besi ortamı 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar, ve 1 mg l<sup>-1</sup> BA ile desteklenmiştir.

#### **3.2.2.2.2. Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi**

Serada saksılarda yetiştirilen karpuz fidelerinden elde edilen bitkisel eksplantların yüzey sterilizasyonu için %4'lük NaOCl'de optimum immersiyon süresini tespit etmek için, eksplantlar 4, 8, 16 ve 20 dakika ve bir kontrol grubu ile birlikte test edilmişlerdir. Diğer işlemler bir önceki deneyde anlatıldığı gibi uygulanmıştır.

#### **3.2.2.3. *In Vivo*'da Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu**

Bu deneyde tarlada iyi performans gösteren bitkilerden alınan sürgün ve nodal uçlar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Önceki sterilizasyon çalışmalarında kullanılan sterilizasyon yöntemi dikkate alınarak çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmada, %4'lük NaOCl kullanılmıştır. %4'lük NaOCl kullanılarak optimum immersiyon zamanını tespit etmek için

eksplantlar sterilantta 20, 30, 40 ve 50 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Tarladan getirilen materyal 1.5 – 2 cm kesilerek 3-5 dakika musluk suyunda yıkanarak %70' lik alkolde 30 saniye çalkalanmıştır. Eksplantlar; %4 'lük NaOCl'de, 20, 30, 40 ve 50 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Daha sonra steril distile su ile 5 kez 5' er dakika çalkalanarak NaOCl'ten arındırılmıştır. Steril kurutma kağıtları arasında steril pens ve bistüri yardımıyla materyalin NaOCl' ten zarar gören kısmı kesilerek Magenta GA-7 kültür kaplarına her birinde 3'er eksplant olacak şekilde aktarılmıştır. Bu deneyde kullanılan MS besi ortamı 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar, ve 1 mg l<sup>-1</sup> BA ile desteklenmiştir.

### 3.2.3. Kültür Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

Kültür koşullarının optimizasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneylerde eksplant olarak kullanılan 5 günlük kotiledonlar, steril kabin içerisine alınmadan önce kotiledonların içinde bulunduğu tüpler veya kültür kapları alkolle silinerek kabine alınmışlardır. Kültür kaplarından çıkarılan kotiledonlar, hipokotilden itibaren 2-3 mm kesilerek kültüre alınmıştır. Magenta GA-7 kültür kaplarına 50-60 ml besi ortamı konmuştur. Bir kültür kabına 3 ya da 4 eksplant aktarılarak kültürler, büyüme odasında inkübasyona alınmıştır.

Tüm bu çalışmalarda en az 20 eksplant kullanılmış ve deneyler en az iki defa tekrarlanmıştır. 28 günlük kültür sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır;

**Eksplant başına düşen sürgün sayısı;** kültürlerin 28 günlük gelişimleri dikkate alınarak bir eksplant üzerinde gelişen sürgünler, altkültür esnasında steril kabin içerisinde veya dışarıda sayılarak ortalaması alınmıştır.

**Eksplant başına sürgünlerin uzunluğu (cm);** 28 günlük kültür sonucu bir eksplantta gelişen sürgünler dijital kumpasla ölçülerek ortalaması alınmıştır.

Kültür koşullarının optimizasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır;

#### 3.2.3.1. Farklı Besi Ortamlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyonuna, farklı besi ortamlarının; Murashige ve Skoog, White Plant Medium, Schenk and Hilderbrandt (MS,WPM,SH) etkileri araştırılmıştır. MS basal besi ortamına ve kullanılan diğer besi ortamlarına, 1 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ilave edilmiştir. Kültürler bölüm 3.2.1.9'da verilen kültür ortamında inkübe edilmiştir.

### 3.2.3.2. MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, Diyarbakır Sürme karpuz çeşidinin sürgün proliferasyonuna MS besisi ortamı kuvvetlerinin (1/1 MS, ½ MS, ¼ MS ve 2 MS) etkisi araştırılmıştır. MS basal besisi ortamının 1 litredeki komponentleri 1/1MS, ½ MS, ¼ MS ve 2 MS yoğunluklarında hazırlanarak kullanılmıştır. Bölüm 1’de verilen MS basal besisi ortamı ve farklı yoğunluklarda hazırlanan MS besisi ortamları 1 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenerek kullanılmıştır. Kültür kaplarına aktarılan kotiledonlar, bölüm 3.2.1.10’da verilen büyüme ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.3.3. pH’nın Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin kotiledonlarından itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine farklı pH değerlerinin (5.5 – 5.6 – 5.7 – 5.8 – 5.9 ) etkisi araştırılmıştır. Bölüm 3.2.1.1’de verilen MS basal besisi ortamına ve 1mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7g l<sup>-1</sup> agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besisi ortamının pH değerleri dijital pH metre ile ölçülüp istenilen değerlere ayarlanmıştır. Bu konuyla ilgili bilgiler bölüm 3.2.1.1.’de anlatılmıştır.

### 3.2.3.4. Agar Konsantrasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin kotiledonlarından itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine agarın farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Bölüm 3.2.1.1’de verilen MS basal besisi ortamına, agar konsantrasyonlarının her serisi (6, 7, 8, 9 ve 10 g l<sup>-1</sup>) 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA ve 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ile desteklenmiştir.

### 3.2.3.5. Şeker Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin kotiledonlarından itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine farklı şeker tiplerinin; sakkaroz, glikoz, maltoz, dekstroz ve fruktoz etkisini test etmek için araştırılmıştır. MS basal besisi ortamı, 1 mg l<sup>-1</sup> BA, 7 g l<sup>-1</sup> agar ve her şeker tipinden 30 g l<sup>-1</sup> ilave edilerek hazırlanmıştır. Kültürler kültür ortamında inkübe edilmiştir.

### 3.2.3.6. Sakkarozun Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin sürgün proliferasyonuna, bir önceki deneyde seçilen uygun şeker tipi olan sakkarozun farklı konsantrasyonlarının ((%1, %2, %3, %4, %6, %8, %10) etkisi araştırılmıştır. Bölüm 3.2.1.1’de verilen MS basal besi ortamına  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar ve belirtilen oranlarda (10, 20, 30, 40, 60, 80 ve  $100 \text{ g l}^{-1}$ ) sakkaroz ilave edilerek hazırlanmıştır.

### 3.2.3.7. Eksplant Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde sürgün proliferasyon çalışmalarında kullanılacak eksplant tipini tespit etmek için materyal kısmında anlatıldığı gibi Diyarbakır Sürme karpuz varyetesinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları (0.5-1.5 cm) ve bahçeden alınan sürgün uçları (2-3 cm) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.1.1.’de anlatılan MS basal besi ortamına  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sakkaroz,  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar ilave edilerek hazırlanmıştır. Materyalin sterilizasyonu. bölüm 3.2.2.3’te anlatıldığı gibi yapıldıktan sonra eksplantlar kültür ortamında inkübe edilmiştir.

### 3.2.3.8. Eksplant Büyüklüğünün Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, Sürme çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan elde edilen kotiledon büyüklüğünün (hipokotilden itibaren 0.5, 1, 1.5 ve 2 cm uzunluğunda kesilerek) sürgün proliferasyonuna, etkisi araştırılmıştır. MS basal besi ortamına  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sakkaroz,  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar ilave edilmiştir.

### 3.2.3.9. Işık Yoğunluğunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin sürgün proliferasyonuna, ışık yoğunluğunun (20  $\mu\text{mol}$ , 30  $\mu\text{mol}$ , 40  $\mu\text{mol}$  ve kontrol) etkileri araştırılmıştır. Büyüme odasında ışık yoğunluğu, ışık ölçerle ölçülerek tespit edilmiştir. MS basal besi ortamına  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sakkaroz ve  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar ilave edilerek hazırlanmıştır. Steril kabinde kültür yapıldıktan sonra kültür kapları, büyüme odasında daha önce ölçülen konumlara yerleştirilerek gelişmeye bırakılmıştır.

### 3.2.4. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneylerde, eksplant olarak kullanılan 5 günlük kotiledonlar, steril kabin içerisine alınmadan önce kotiledonların içinde bulunduğu tüpler veya kültür kapları alkolle silinerek kabin içine alındılar. Kültür kaplarından çıkarılan kotiledonlar, hipokotilden itibaren 2-3 mm kesilerek kültüre alındı. Magenta GA-7 kültür kaplarına 50-60 ml besi ortamı konmuştur. Bir kültür kabına 3'er eksplant aktararak kültürler, büyüme odasında inkübasyona alınmıştır.

Tüm bu çalışmalarda en az 20 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır;

**Eksplant başına gelişen sürgün sayısı;** kültürlerin 28 günlük gelişimleri dikkate alınarak bir eksplant üzerinde gelişen sürgünler, altkültür esnasında steril kabin içersinde veya dışarıda sayılarak ortalaması alınmıştır.

**Eksplant başına oluşan sürgünlerin uzunluğu (cm);** 28 günlük kültür sonucu bir eksplant üzerinde gelişen sürgünler dijital kumpasla ölçülerek ortalaması alınmıştır.

Bu çalışma kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

#### 3.2.4.1. Sitokin Tipi ve Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

##### 3.2.4.1.1. BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, "Sürme"nin *in vitro* sürgün proliferasyonuna, BA'nın farklı konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 mg l<sup>-1</sup>) kontrol grubuyla birlikte (hormonsuz) etkileri araştırılmıştır. MS basal besi ortamına yukarıda belirtilen BA'nın farklı konsantrasyonlarının her bir serisine ve hormonsuz kontrol grubuna, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 7 g l<sup>-1</sup> agar ilave edilerek hazırlanmıştır.

##### 3.2.4.1.2. Kinetinin Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, "Sürme" çeşidinin sürgün proliferasyonuna, kinetinin farklı konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 mg l<sup>-1</sup>) kontrol grubuyla birlikte etkileri araştırılmıştır. MS basal besi ortamına yukarıda belirtilen kinetinin farklı konsantrasyonlarının her bir serisine ve hormonsuz kontrol grubuna, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 7 g l<sup>-1</sup> agar ilave edilerek,

MS basal besi ortamı hazırlanmıştır. Kùltürler daha önce anlatılan kùltür ortamında inkùbe edilmiştir.

#### 3.2.4.2. BA'ya Oksin İlavésinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyonunu artırmak için en iyi BA konsantrasyonuna (0.5 mg l<sup>-1</sup>) 0.1 mg l<sup>-1</sup> IAA, IBA ve NAA) ilavesinin etkisi araştırılmıştır. Kùltür koşulları daha önce anlatıldığı gibidir.

#### 3.2.4.3. Eksplant Yaşının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının 5 - 10 ve 15 günlük kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. MS basal besi ortamına 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7g l<sup>-1</sup> agar ilave edilerek hazırlanmıştır. Kùltürler, kùltür ortamında inkùbe edilmiştir.

#### 3.2.4.4. Altkùltür Sayısının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılmıştır. 4 haftalık kùltür sonunda oluşan sürgünler, 1. altkùltüre alınmıştır. 4 haftalık kùltür sonunda buradan elde edilen sürgünler 2. altkùltüre ve 4 hafta sonunda buradan oluşan sürgünler de 3. altkùltüre alınmıştır. Yapılan 1., 2. ve 3. altkùltürlerde, MS basal besi ortamı, 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenerek kullanılmıştır.

#### 3.2.4.5. Kùltürde Bekletme Süresinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna ve kùltürde bekletme süresinin (3 - 4 ve 5 hafta) etkileri araştırılmıştır. Oluşan sürgünler altkùltüre alınmaksızın kùltür kaplarında 3 hafta, 4 hafta ve 5 hafta bekletilerek en uygun süre tespit edilmeye çalışılmıştır. MS basal besi ortamına, 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ilave edilerek kullanılmıştır.

#### 3.2.5. Rejenerantları Köklendirme Çalışmaları

*In vitro* 'da çoğaltılan sürgünlerin köklendirme çalışmaları yapılmıştır. Eksplant olarak kullanılan sürgünler, 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA + 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz + 7 g l<sup>-1</sup> agar ile destekli MS besi



ortamının kullanıldığı sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilmiştir. Tüm bu çalışmalarda en az 20 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır;

**Köklenen eksplant yüzdesi;** 28 günlük kültür sonucu köklenen eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

**Eksplant başına oluşan kök sayısı;** 28 günlük kültür sonucu köklenen bir eksplantta oluşan primer kök sayısının ortalaması alınarak ifade edilen değerdir.

**Oluşan primer kök uzunluğu;** 28 günlük kültür sonucu köklenen eksplanttaki primer kök uzunluğu dijital kumpasla ölçülerek bulunmuştur.

**Adapte olan fide yüzdesi;** büyüme odasında köklendirilen fidelerin sera koşullarına aktarıldıktan 20 gün sonra gelişme gösteren fide sayısının tüm fidelere oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilen değerdir.

Sürgünlerin köklendirme çalışmaları kapsamındaki deneyler aşağıda sıralanmıştır.

### 3.2.5.1. Oksinlerin Köklenmeye Etkisi

Büyüme odasından getirilen ve sürgün proliferasyon kültürlerini içeren Magenta GA-7 kültür kapları, alkolle tüm yüzeyi silinerek steril kabin içine alınmıştır. 4 haftalık kültür sonunda kotiledonlardan çoğalan sürgünler, kültür kaplarından çıkarılarak, köklenmeye elverişli olanlar aşağıda anlatılan köklendirme ortamlarına aktarılmıştır.

#### 3.2.5.1.1. IAA'nın Köklenmeye Etkisi

IAA'nın köklenmeye etkisinin araştırıldığı çalışmada IAA'nın farklı konsantrasyonları olarak; 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> kullanılmıştır. IAA'nın her serisi için hazırlanan MS besi ortamı, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenmiştir.

#### 3.2.5.1.2. IBA'nın Köklenmeye Etkisi

IBA'nın köklenmeye etkisinin araştırıldığı çalışmada IBA'nın farklı konsantrasyonları olarak; 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> kullanılmıştır. IAA'nın her serisi için hazırlanan MS besi ortamı, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenmiştir.

### 3.2.5.1.3. NAA'nın Köklenmeye Etkisi

NAA'nın köklenmeye etkisinin araştırıldığı çalışmada NAA'nın farklı konsantrasyonları olarak; 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> kullanılmıştır. IAA'nın her serisi için hazırlanan MS besi ortamı, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenmiştir.

### 3.2.5.2. Altkültür Sayısının Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyon çalışmalarında; 1. altkültür, 2. altkültür ve 3. altkültürden elde edilen sürgünler kullanılmıştır. Köklenmeye elverişli olan sürgünler (1,5-2 cm) steril kabin içinde kültür kaplarından çıkarılarak; 1 mg l<sup>-1</sup> NAA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 7 g l<sup>-1</sup> agar içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

### 3.2.5.3. Eksplant Tipinin Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* şartlarda çoğaltılan eksplant tiplerinin köklenmeye etkisini araştırmak için eksplant olarak nodal ve apikal segmentler kullanılmıştır. kullanılan eksplantlar, sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilmiştir. Bu amaçla köklenmeye elverişli olan sürgünler 1 mg l<sup>-1</sup> NAA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

### 3.2.5.4. Karanlık İşleminin Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, karanlığın köklenme üzerine etkisini araştırmak için eksplant olarak, proliferasyon çalışmaları sonunda elde edilen sürgünler kullanılmıştır. Köklenme ortamına aktarılacak sürgünler, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7 g l<sup>-1</sup> agar içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Büyüme odasına aktarılan kültürler 3 gün, 5 gün, 7 gün ve sürekli karanlıkta (28 günlük kültür süresince) bırakılmıştır. Karanlık ortamın sağlanması için kültür kapları, alüminyum folyo ile iki kat sarılıp üzerine mukavva kutu konarak gelişmeye bırakılmıştır.

### 3.2.6. Aklimatizasyon

Aklimatizasyonda izlenen yöntem; Compton ve Gray (1993) ve Compton ve ark. (1993, 1996) tarafından yapılan çalışmalardan uyarlanmıştır.

*In vitro*' da köklenmiş fidelerin doğal şartlara adaptasyonunda aklimatizasyon için substrat olarak tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve hiç sterilize edilmemiş torf

kullanılmıştır. *In vitro*'da köklenen fideler jelozlarından dikkatli bir şekilde ayrıldıktan sonra 7 cm çapında plastik saksılara dikilmişlerdir. Bu fide saksıları iyice sulandıktan sonra üzerleri 100 ml' lik beherle kapatılır. Bu saksılara daha sonra, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotlu ve ışık yoğunluğu  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  olan büyüme odasında gelişmeye bırakılır. Fideler ihtiyaç duyuldukça gün aşırı olarak distile su ile düzenli olarak sulanarak nemi kontrol altında tutuldu. Büyüme odasında gelişen fideler 7. günden itibaren üzerleri aşamalı olarak (7. günde 10 dakika, 8. günde 20 dakika, 9. günde 1 saat, 10. günde 2 saat, 11. günde 4 saat) 4-5 gün içinde tamamen açılır. Büyüme odası koşullarında 7 gün daha bekletilerek gelişen fideler 21. günde 1:1:1 oranında torf : kum : toprak karışımı içeren 13 cm çapında olan daha büyük saksılara torfla birlikte transfer edilir. Fideler daha sonra sera koşullarına aktararak gelişmeye bırakılır. Gelişen fideler, 21 gün sonra dış ortama adaptasyonunu sağlamak için araziye şaşırtılır. Büyüme odasında gelişmeye bırakılan fidelerin üzerinin saydam plastik örtü ile örtülmesi durumunda ise, plastik örtü kademeli olarak delinerek üzeri tamamen açılmıştır. 5. günden itibaren plastik örtü delinmeye başlanır ve her gün delik sayısı artırılarak 11. günde tamamen plastik örtü kaldırılır. Bundan sonraki aşama yukarıdaki gibi uygulanır.

### 3.2.6.1. Aklimatizasyonda Kullanılan Substratın Sterilizasyonu

Aklimatizasyon çalışmalarında substrat olarak torf kullanılmıştır. Kullanılan substrat 3 şekilde sınıflandırılmıştır.

**1. Sterilize edilmiş torf:** 2.5 litrelik torf, 2 kat alüminyum folyoya sarılıp  $121^\circ\text{C}$ 'de ve 1 atmosfer basınçta 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır.

**2. Yarı sterilize edilmiş torf:**  $121^\circ\text{C}$ 'de ve 1 atmosfer basınçta 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edilen torf ile steril edilmemiş torfun 1:1 oranında karışımından oluşmaktadır.

**3. Non-sterilize torf:** sterilize edilmeden kullanılan torftur.

### 3.2.7. Tetraploid Oluşturulması

Tetraploid oluşturulması, karpuz ıslahında kullanılan ve triploid karpuz tohumlarının elde edilmesinde önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Mevcut diploid kromozom sayısının değişik yollarla ikiye katlanmasıyla oluşturulur. Tetraploid oluşturulmasına yönelik olarak yapılan uygulamaları aşağıda başlıklar halinde şöyle sınıflandırılabilir;

### 3.2.7.1. Tarlada Kolşisin Uygulaması

Tarlaya aktarılmış fidelerin büyüme uçlarına kolşisin uygulaması yoluyla tetraploid oluşturulmaya çalışılmıştır. Fideler henüz gelişim aşamasındayken büyüme uçları %0.2'lik kolşisin çözeltisiyle 24 saat muamele edilmiştir. Bu yöntemle tetraploid elde edilmeye çalışılmıştır. Bu deneyde toplam 10 bitki kullanılmıştır.

### 3.2.7.2. Tohuma Kolşisin Uygulaması

Karpuz tohumlarına, ekilmeden önce kolşisin uygulanmıştır. %0.02'lik olarak hazırlanan kolşisin çözeltisi 3 farklı şekilde uygulanmıştır.

1. Tohumlar, kolşisin çözeltisinde 24 saat bekletilerek
2. Tohumlar kolşisin çözeltisinde 16 saat bekletilerek
3. Tohumlar kolşisin çözeltisinde 8 saat bekletilerek

Kolşisin uygulanan bitkilerde şu ölçümleri yapılmıştır;

**Yaprak uzunluğu (cm):** Yaprığın sapla bağlandığı nokta ile yaprak ucuna kadar olan mesafe yaprağın orta damarı boyunca cetvel yardımıyla bulunmuştur.

**Yaprak genişliği (cm):** Yaprak yüzeyinin en geniş kısmı cetvelle ölçülerek bulunmuştur.

**Bitki boyu (cm):** Bitkide ilk meyvenin görüldüğü dönemde, kotiledon yapraklarından itibaren şerit metre yardımıyla ölçülmüştür.

### 3.2.8. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında kullanılan materyalin ploidi seviyesinin belirlenmesi için araştırma yapılmıştır. Çalışmalarda, ploidi seviyesini tespit etmek için alınacak gözlem, tohumdan yetiştirilen ve oluşan yapraklardan, *in vitro* rejenerantların yapraklarında, tarlada kolşisin uygulanan bitkilere ait yapraklarda ve tohuma kolşisin uygulanan yapraklarda bekçi hücredeki kloroplast sayımı yapılarak tespit edilmiştir. Her ölçümde en az 10 eksplant kullanılmış ve sayılan toplam kloroplast sayısının ortalaması hesaplanmıştır.

#### 3.2.8.1. Bekçi Hücredeki Kloroplast Sayımı

Tohumdan çimlendirilerek oluşan 4 haftalık bitkilerden, *in vitro* rejenerantlardan (NAA'lı ortamdaki) ve tarlada kolşisin uygulanan bitkilerden, tohuma kolşisin uygulanarak oluşan bitkilerden alınan yapraklar kullanılmıştır. Yaprakların alt epiderması jilet yardımıyla

çıkarılıp lam üzerine yerleştirilip bir damla distile su damlatılarak üzerine lamel konulmuştur. Işık mikroskobu altında incelenerek kloroplast sayımı yapılmıştır. Her materyalden en az 20 adet örnek incelenmiştir. Tespit edilen ploidi seviyeleri mikroskoba uyumlu Nikon 4500 Coolpix dijital fotoğraf makinesiyle 4x100 büyütme ışık mikroskobunda görüntüsü fotoğraflanmıştır.

### 3.2.8.2. *In Vitro* Rejenerantlarda, Tohumdan Yetiştirilen Bitkilerde, Kolşisin Uygulanan Tohum ve Bitkilere Ait Yapraklarda Ploidinin Belirlenmesi

*In vitro* sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilen sürgünler kullanılmıştır. 5 günlük kotiledonlar, 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA, 7 g l<sup>-1</sup> agar ve 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ile destekli MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. 4 hafta sonunda oluşan sürgünler, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 7 g l<sup>-1</sup> agar ile desteklenmiş MS besi ortamında köklenme ortamına aktarılmıştır. 4 haftalık kültür sonucu seraya aklimatizasyondan sonra tam gelişmiş yapraklar kullanılmıştır. Alınan yapraklar yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanarak mikroskopta incelenmiştir.

“Sürme” çeşidinin, tohumdan yetişen ve hiçbir kimyasal uygulama yapılmayan bitkilerinden alınan tam gelişmiş yapraklar incelenmiştir. Yapraklarda kloroplast sayımı yukarıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

“Sürme” çeşidine ait kolşisin uygulanan tohumlarda gelişen en az bir aylık yapraklarda kloroplast sayımı yapılmıştır.

Tarlada büyüme uçlarına kolşisin uygulanan fideler kullanılmıştır. Bitkiler gelişip ilk çiçekler oluştuğu dönemde, bunlardan alınan yapraklardan kloroplast sayımı yapılarak ploidi seviyesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

### 3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün çalışmalar tesadüf parselleri deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri yapılmıştır (Sigma Plot 2.0). Test edilen işlemler arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için, faktoriyel veya non-faktoriyel deneylerden alınan veriler ANOVA'ya tabi tutulmuşlardır. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar P = 0.05 seviyesinde (Student) *t*-testine tabi tutulmuştur.

Oransal veriler durumunda Ki kare ( $\chi^2$ ) testi uygulanmıştır.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

$P > 0.05$  = önemli değil

$P < 0.05$  = nemli

$P < 0.01$  = çok önemli

$P < 0.001$  = oldukça çok önemli





## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

#### 4.1.1. Olgun Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

##### 4.1.1.1. Kabukları Çatlatılmamış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

“Sürme” çeşidinin tohumlarının aksenik çimlendirilmesi ve dekontaminasyonuna etkisini test etmek için, NaOCl'in, %1, %3, %5, %10, %15 ve %20'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına ait istatistik veriler Çizelge 3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.** Kabukları çatlatılmamış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi\*.

İşlem	Enfekte olan tohum (%)	Çimlenen tohum (%)
Kontrol	100	-
% 1 NaOCl	90	-
% 2 NaOCl	90	-
% 3 NaOCl	90	-
% 5 NaOCl	70	10
% 10 NaOCl	20	20
% 15 NaOCl	20	10
% 20 NaOCl	20	-
$\chi^2$ (s.d:7)	P < 0.01	P < 0.01

\* Sonuçlar kültürün 21. gününde ve 50 tohumun ortalamasını içermektedir.

Test edilen işlemler arasında enfekte olan tohum yüzdelerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar vardır (P<0.01). Gruplar arasında en yüksek enfeksiyon oranı, %100 ile kontrol grubunda görülmüş, bunu %90 enfeksiyon ile %1, %2 ve %3 NaOCl konsantrasyonları izlemiştir. En düşük enfeksiyon %20'lik oranı ile %10, %15 ve %20'lik NaOCl'ten elde edilmiştir. Kültüre alınan tohumların çimlenme oranlarına göre de gruplar arasında istatistik farklılık vardır (P<0.01). Tüm gruplarda çimlenme oranları oldukça düşük çıkmıştır. Konsantrasyonlar arasında en yüksek çimlenme oranı, %20 ile %10'luk NaOCl konsantrasyonundan elde edilmiştir. Kontrol grubuyla birlikte %1, %2 ve %3 NaOCl konsantrasyonlarında enfeksiyondan dolayı çimlenme olmamıştır. Diğer yüksek

konsantrasyonlarda çimlenme oranlarının düşük yada hiç olmaması tohumların aşırı sterilize olmasından kaynaklanmıştır.

Bu deneyin sonucunda tohumların *in vitro* şartlarda çimlenmesi ve sterilizasyonu için NaOCl'in gerekli olduğu ve fenolik bileşik salgılamalarından dolayı kabuklarının çıkarılması veya çatlatılması gerektiği sonuçlarına varılmıştır. Ayrıca tohumların çimlenmeleri için optimum sürenin (5-7 gün) üstünde bir zamana ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı diğer deneylerde tohumların dış sert kabuklarının çıkarılarak veya çatlatılarak yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

#### 4.1.1.2. Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde kabuklarından ayrılmış "Sürme" tohumlarının, NaOCl'in %1, %2, %3, %5 ve %10'luk konsantrasyonlarında 5 dakika bekletilmesinin, çimlenmeye etkisi araştırılmıştır. 21 günlük kültür sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Kabukları çatlatılmış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi .

İşlem	Enfekte olan kültür (%)	Çimlenen kültür (%)
Kontrol	100	-
% 1 NaOCl	25	30
% 2 NaOCl	25	10
% 3 NaOCl	-	100
% 5 NaOCl	25	20
% 10 NaOCl	20	60
$\chi^2$ (s.d:5)	P < 0.01	P < 0.01

\* Sonuçlar kültürün 21. gününde ve 20 tohumun ortalamasını içermektedir

Kültürlerin enfeksiyon oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttur (P<0.01). En yüksek enfeksiyon oranı kontrol grubu (%100) başta olmak üzere, %25'lik oran ile %1, %2 ve %5 NaOCl konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Uygulamalar arasında %3 NaOCl konsantrasyonunda enfeksiyon görülmemiştir. Kontrol grubu dahil olmak üzere %3'lük NaOCl dışındaki diğer konsantrasyonlarda yüksek oranda enfeksiyon olduğu tespit edilmiştir.

Çimlenme oranları bakımından gruplar arasında istatistikî farklılık önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Çimlenme yüzdeleri bakımından ise %3'lük NaOCl'in en yüksek (%100) çimlenme yüzdesine sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük çimlenme oranı ise, %10'luk değer ile %2 NaOCl konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Yapılan istatistik analizine göre konsantrasyonlar arasında en düşük enfeksiyon vermesi ve en yüksek çimlenme oranları bakımından en iyi sonucu, %3 NaOCl uygulaması vermiştir. Bu deneyin sonucunda kabukları çatlatılmış karpuz tohumlarının sterilizasyonu için %3 NaOCl + 5 dakikalık uygulamanın kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Ancak optimum sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi için tohumların %3 NaOCl'çözeltisinde farklı sürelerde bekletilmesi gerektiği dikkate alınarak, deneyin devamı niteliğindeki süreye bağlı araştırmanın yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kabukların çatlatılmasının tohumlarda çimlenme oranını ve hızını artırdığı ve tohumların bu şekilde kültüre alınmasının daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

#### 4.1.1.3. Kabukları Çatlatılmış 1 Yıllık Tohumların Sterilizasyonuna %3'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde, bir önceki deneyden elde edilen sonuca bağlı kalınarak, %3'lük NaOCl konsantrasyonu kullanılmıştır. Çatlatılmış karpuz tohumlarının %3'lük NaOCl konsantrasyonunda; 1, 2, 4, 5, 10, 15 ve 20 dakika bekletilerek optimum sürenin tespit edilmesi amaçlanmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 5. Kabukları çatlatılmış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna, %3'lük NaOCl'te farklı bekletme sürelerinin etkisi\*.

İşlem	Enfekte olan kültür (%)	Çimlenen kültür (%)
Kontrol	100	-
1 dakika	15	75
2 dakika	10	80
4 dakika	10	80
5 dakika	-	100
10 dakika	20	80
15 dakika	15	80
20 dakika	15	70
$\chi^2$ (s.d:7)	$P<0.01$	$P<0.01$

\* Sonuçlar kültürün 21. gününde ve 20 tohumun ortalamasını içermektedir.

Enfeksiyon oranları bakımından gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.01$ ). Deneyde, 5 dakika sterilantta bekletilen kültürde hiç enfeksiyon görülmezken, en yüksek enfeksiyon oranı 10 dakika bekletilen kültürlerde %20 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda, beklendiği gibi %100 enfeksiyon çıkmıştır. Bununla birlikte kontrol grubu dışında tüm süreler enfeksiyon oranları bakımından iyimser sonuçlar vermiştir.

Grupların çimlenme oranları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar vardır ( $p < 0.01$ ). Çimlenme oranı yönünden en yüksek değer %100 olarak 5 dakikalık kültürlerden elde edilirken, kontrol grubundan sonra en düşük oran ise %70 ile 20 dakikalık kültürlerden sağlanmıştır. Çimlenme oranları bakımından da tüm gruplar iyimser sonuçlar vermiştir.

Bu deney sonucunda, kabukları çatlatılmış karpuz tohumlarının yüzey sterilizasyonu için en iyi NaOCl konsantrasyonunun ve süresinin; **%3 NaOCl + 5 dakika** olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.1.1.4. Taze Tohumların Sterilizasyonu

Bu deneyde, karpuz meyvesinden çıkarılan taze tohumlar için sterilizasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Taze meyvenin bulunduğu mevsimlerde direkt meyveden alınan karpuz tohumlarının organojenezis potansiyelinin yüksek olacağı düşünülerek çalışmalarda kullanılması uygun görülmüştür. Tohumların yüzey sterilizasyonu ile ilgili çalışmalarda elde edilen sonuçlardan yararlanılarak %3 NaOCl + 5 dakika'lık uygulama ile birlikte farklı uygulamaların etkisi araştırılmıştır. Bunlar şöyle sıralanmaktadır:

1. Meyveden çıkarılan tohumları hiçbir işleme tabi tutmadan direkt besi ortamına aktarılması (kontrol).
2. Meyveden çıkarılan çekirdeklerin sadece steril saf suda çalkalanıp besi ortamına aktarılması (SS).
3. Meyveden çıkarılan tohumların steril saf suda çalkalanıp pens ve bistüri yardımı ile kabukları çatlatılıp besi ortamına aktarılması (SSÇ).
4. Meyveden çıkarılan tohumların %3'lük NaOCl'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına kabuklu halde aktarılması (%3 + SS).
5. Meyveden çıkarılan tohumların %3'lük NaOCl'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına kabuksuz halde aktarılması (%3 + SSK).
6. Meyveden çıkarılan tohumların %3'lük NaOCl'e tabi tutulup steril saf suda 5 kez çalkalanıp besi ortamına çatlatılarak aktarılması (%3 + SSÇ).

Yapılan istatistik analiz sonucu test edilen uygulamalar arasında enfekte olan kültür oranları bakımından istatistiksel farklılık olmadığı görülmüştür ( $P>0.01$ ). Bununla birlikte, %3 + SS ile %3 + SSÇ grupları ve SS ile %3 + SSK gruplarının aynı enfekte oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Enfekte olan kültür yüzdesi bakımından en iyi sonucu %0 enfeksiyon ile %3 + SS ve %3 + SSÇ uygulamalarının verdiği tespit edilirken en yüksek enfekte oranı ise %20 ile kontrol grubunda görülmüştür (Çizelge 6).

**Çizelge 6.** Taze tohumların sterilizasyonuna farklı uygulamaların etkisi\*.

İşlem	Enfekte olan (%)	Çimlenen kültür (%)
Kontrol	20	20
SS	10	50
SSÇ	5	90
%3 + SS	-	10
%3 + SSK	10	100
%3 + SSÇ	-	100
$\chi^2$ (s.d:5)	$P>0.01$	$P<0.01$

\* Sonuçlar kültürün 21. gününde ve 20 tohumun ortalamasını içermektedir.

Çimlenme yüzdeleri bakımından ise gruplar arasında istatistiki farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.01$ ). Çimlenme oranı itibarıyla en yüksek değer (%100) %3 + SSÇ ve %3 + SSK gruplarından elde edilmiştir. En düşük çimlenme oranı ise, beklenenin aksine kontrol grubunda olmayıp %3 + SS grubunda %10 olarak bulunmuştur. Tüm uygulamalardan alınan sonuçlara göre büyük oranda enfeksiyon çıkmamış olsa bile çimlenme yüzdeleri bakımından meyveden çıkarılan tohumlara sterilizasyonun yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlardaki diğer bir önemli nokta ise; SSÇ uygulamasında enfeksiyon oranı %5 olduğu yani oldukça düşük sayılabilen bir değer iken çimlenme oranı ise %90 gibi yüksek bir değer elde edilmiştir. Yani çimlenme oranlarının yüksek çıkması için tohumların çatlatılarak veya kabuksuz olarak kültüre alınması daha uygundur. Bununla birlikte, yapılan uygulamalar arasında kültürlerin gelişimi ve enfeksiyon oluşumu bakımından taze tohumların yüzey sterilizasyonu için en iyi uygulamanın, %3 NaOCl + SSÇ olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.1.2. Serada Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu

##### 4.1.2.1. Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Karpuzun doğal yetiştirme mevsimi dışında eksplant ihtiyacını karşılamak amacıyla mikroçoğaltım çalışmaları için serada saksılara tohum ekip fide yetiştirilmesi amaçlanmıştır. Bu deneyde saksılarda yetiştirilen karpuz fidelerinden elde edilen bitkisel eksplantların yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisinin test edilmesi amaçlanmıştır. Eksplantlar, yüzey sterilizasyonu için NaOCl'in %1, %2, %3 ve %4'lük konsantrasyonlarında 2 dakika bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7'de gösterilmiştir.

Çizelge 7. Fidelerden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi\*.

İşlem (2 dakika)	Enfekte olan (%)	Gelişen kültür (%)
Kontrol	100	-
%1 NaOCl	90	-
%2 NaOCl	80	10
%3 NaOCl	80	15
%4 NaOCl	60	35
$\chi^2$ (s.d:4)	P<0.01	P<0.01

\* Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 eksplantın ortalamasını içermektedir.

Enfekte olan kültür oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur (P<0.01). Gruplar arasında en yüksek enfeksiyon oranı %100 ile kontrol grubunda görülmüş ve bunu %90 enfeksiyon oranı ile %1 NaOCl konsantrasyonu izlemiştir. En düşük enfeksiyon %60'luk oranı ile %4 NaOCl konsantrasyonundan elde edilmiştir. Sterilizasyon çalışmalarında enfekte olan kültür oranı ne kadar düşük ise çalışma daha başarılı bulunur. Bununla birlikte tüm gruplarda enfeksiyon oranları bakımından istatistiksel farklılık olmasına rağmen, enfeksiyon oranının tüm konsantrasyonlarda yüksek sayılabilecek bir değerde olduğu görülmektedir.

Gelişen kültür oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık olduğu tespit edilmiştir (P<0.01). Gruplar arasında en yüksek gelişme oranı, %35 ile %4 NaOCl konsantrasyonunda izlenirken, en düşük oran ise kontrol grubuyla aynı değere sahip olan %1



NaOCl konsantrasyonunda görülmüştür. Gelişen kültür oranları bakımından elde edilen sonuçlar tatmin edici bulunmamakla birlikte, bu durum enfekte olan kültür oranlarının yüksek çıkmasının bir sonucu olarakta değerlendirilebilir. Ancak enfekte olan kültür oranları ve buna bağlı olarak gelişen kültür oranlarına ait veriler yapılacak bir sonraki deney için bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Kültürlerin enfeksiyon yüzdeleri ve gelişme durumları dikkate alındığında eksplantların yüzey sterilizasyonu için NaOCl'in optimum konsantrasyonun %4 olduğu söylenebilir. Ancak eksplantların, %4 NaOCl'te farklı sürelerde bekletilmesi halinde daha iyi sonuçların elde edileceği düşünülmüş ve bir sonraki aşama olarak süreye bağlı deney yapılmıştır.

#### 4.1.2.2. Fidelerden Alınan Eksplantların Sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi

Serada saksılarda yetiştirilen karpuz fidelerinden elde edilen eksplantların yüzey sterilizasyonu için %4'lük NaOCl'de optimum immersiyon süresini tespit etmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Eksplantlar, %4 NaOCl'te 4, 8, 16, 20 dakika ve bir kontrol grubuyla birlikte test edilmişlerdir. Deney sonuçlarına ait veriler Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. Fidelerden alınan eksplantların sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te farklı bekletme sürelerinin etkisi\*.

İşlem	Enfekte olan (%)	Gelişen kültür (%)
Kontrol	100	-
4 dakika	60	30
8 dakika	20	60
16 dakika	10	70
20 dakika	10	90
$\chi^2$ (s.d:4)	P<0.01	P<0.01

\* Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 eksplantın ortalaması içermektedir.

Test edilen immersiyon süreleri arasında kültürlerin enfekte olma oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık vardır (P<0.01). Enfekte olan kültür oranları bakımından en yüksek oranın %100 ile kontrol grubunda olduğu ve bunu %60'lık oran ile 4 dakikalık immersiyon süresinin izlediği görülmüştür. Kültürler arasında en düşük enfeksiyon oranı, %10, 16 ve 20 dakikalık sürelerde tespit edilmiştir. Ancak tercih

yapabilmek için her iki gruba ait kültürlerin gelişme durumlarıyla birlikte değerlendirmek gerekir.

İmmeriyon sürelerinin gelişen kültür oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar vardır ( $P<0.01$ ). Gelişen kültür oranı en yüksek, %90 ile 20 dakikalık kültürlerde görülmüş en düşük oran ise kontrol grubundan sonra %30'luk oran ile 4 dakikalık uygulamada tespit edilmiştir. Her iki özellik açısından bir değerlendirme yapılırsa, 8 dakika ve 16 dakikalık uygulamalarda enfekte olmayan kültür yüzdesi yüksek iken gelişen kültür yüzdesi daha düşüktür. Bu durum kültürlerin enfekte olmadığı fakat gelişme de göstermediğini ortaya koymaktadır. Ancak bu oran bile 20 dakikalık uygulamadan (%10) daha düşük orandadır.

Kültüre alınan eksplantların enfekte olma yüzdeleri ve gelişme durumları dikkate alındığında **20 dakika** optimum bekletme süresinde enfeksiyon oranının düşük olması ve buna paralel olarak gelişen kültür oranının yüksek olmasından dolayı diğer gruplara göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

#### **4.1.3. *In Vivo*'da Yetiştirilen Fidelerden Alınan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu**

Bu deneyde, tarlada iyi performans gösteren fidelerden alınan sürgün ve nodal uçların eksplant olarak kullanılması için bir sterilizasyonun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bir önceki deneyde elde edilen sonuç dikkate alınarak %4'lük NaOCl kullanılmıştır. Ancak doğada yetişen bitki sürgünlerinin aynı konsantrasyondaki sterilanta karşı daha dirençli olacağı düşünülerek sadece immersiyon süresi artırılarak çalışma yürütülmüştür. Eksplantlar, %4'lük NaOCl kullanılarak optimum immersiyon zamanını tespit etmek için 20, 30, 40 ve 50 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Deneyle ilgili sonuçlar, Çizelge 9'da verilmiştir.

Eksplantların, %4'lük NaOCl'te farklı sürelerde bekletilmesinde kültürlerin enfekte olma oranları bakımından istatistiksel farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.01$ ). Enfeksiyon oranı en düşük %5 ile %4 NaOCl + 40 dk uygulamasından elde edilmiştir. Ayrıca, %4 NaOCl + 20 dk uygulamasında ise enfeksiyon oranı %50 olarak tespit edilirken en yüksek enfeksiyon oranı, kontrol grubunda %100 olarak bulunmuştur.

Gelişen kültür oranları bakımından ise gruplar arasında istatistiksel farklılık olduğu görülmüştür ( $P<0.01$ ). Gelişme oranı en yüksek, %4 NaOCl + 40 dk kültürlerinde %95 olarak bulunurken, en düşük gelişme oranı ise kontrol grubundan sonra %50 ile %4 NaOCl + 20 dk uygulamasından elde edilmiştir.

Karpuz bitkisinden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna kültürlerin enfekte olma yüzdeleri bakımından en iyi sonucu %4 NaOCl + 40 dk (%5 enfeksiyon) ve buna yakın değer veren %4 NaOCl + 50 dk (%10 enfeksiyon) uygulamalarının verdiği tespit edilmiştir. Ancak gelişen kültürlerin yüzde oranları bakımından ise en iyi sonucu, %4 NaOCl + 40 dk (%95 gelişen kültür) uygulamasının verdiği tespit edilmiştir. %4 NaOCl + 50 uygulamasında gelişen kültür oranının %4 NaOCl + 40 dk uygulamasından daha düşük olması, kültürlerde sterilantın aşırı etkisinden kaynaklanmıştır.

**Çizelge 9.** Açıkta yetiştirilen fidelerden alınan eksplantların sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te farklı bekleme sürelerinin etkisi\*

İşlem	Enfekte olan (%)	Gelişen kültürlerin (%)
Kontrol	100	-
%4 NaOCl + 20 dk	50	50
%4 NaOCl + 30 dk	25	60
%4 NaOCl + 40 dk	5	95
%4 NaOCl + 50 dk	10	70
$\chi^2$ (s.d:4)	P<0.01	P<0.01

\* Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 eksplantın ortalaması içermektedir.

Açıkta yetiştirilen karpuz bitkilerinden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonu için kültürlerin enfekte olma yüzdeleri ve gelişen kültür yüzdeleri dikkate alındığında %4 NaOCl'de optimum bekleme süresinin **40 dakika** olduğu görülmüştür.

#### 4.1.4. Tohum ve Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Değerlendirme

Karpuz proliferasyon çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılan bir yıllık olgun tohumların veya meyveden çıkarılan taze tohumların yüzey sterilizasyonunun gerekli olduğu yapılan araştırma sonucunda görülmüştür. Tohumların sterilizasyonu ile ilgili olarak bir çok araştırmacı benzer yüzey sterilizasyonu yöntemleri geliştirmişlerdir. Karpuzun *in vitro* çalışmalarında tüm araştırmacılar tohumdan eksplant eldesine çalışmışlardır. **Compton ve Gray (1993a)**, yaptıkları bir çalışmada *in vitro* fide elde etmek için, embriyoları tohumdan çıkarıp, 10-25 dakika %1-3'lük NaOCl'te bekleterek steril etmişlerdir. Daha sonra 3-6 kez steril distile suda çalkalamışlardır. Küçük tohumlu çeşitlerin, 10-15 dakika, %1 NaOCl'de bekletilebileceğini fakat büyük tohumlularda ise 20-25 dakika ve %1.3'lük daha yüksek NaOCl konsantrasyonunda bekletilmeye ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir. Diğer bir

uygulamada ise; tohumlar 15 saat %2.6'lık NaOCl'de bırakıldıktan sonra 15 saat steril distile suda imbibisyonda tutulup daha sonra embriyoları çıkarılmıştır.

**Compton (1999)**, yapmış olduğu tüm *in vitro* karpuz adventif sürgün rejenerasyon çalışmalarında; aseptik olarak kotiledon elde etmek için kabuklu haldeki tohumları, %2.5 NaOCl + %0.1 Tween 20'de 30 dakika bekleterek steril etmiş daha sonra tohumlardan çıkarılan embriyoları %1.25 NaOCl + %0.1 Tween 20'de 15 dakika bekleterek sterilizasyonu yaptıktan sonra kültür ortamına aktarmıştır.

Yaptığımız çalışmada karpuz tohumlarının yüzey sterilizasyonunda, en iyi uygulamanın **%3 NaOCl + 5 dakika** olduğu tespit edilmiştir. Bulunan bu değer diğer araştırmacıların bulgularına göre sterilantın konsantrasyonuna eş değerde olmasına rağmen daha kısa bir sürede sterilizasyon tamamlanabilmektedir. Yaptığımız çalışmayla tohumların kabuklu ve kabuksuz olarak ayrı ayrı sterilizasyonuna gerek olmadığı ve kabuklarından ayrılması için uzun süre beklemek yerine kabuklu olarak steril edilebileceği anlaşılmıştır. Kabukların çıkarılması veya çatlatılmasının ise, röpikajdan önce yapılabileceği ve diğer araştırmacıların uyguladığı gibi uzun bir süre beklemeye gerek olmadığı görülmüştür. Bu da sterilizasyon çalışmalarında zaman açısından büyük bir tasarrur sağlamaktadır.

*In vitro* karpuz çalışmalarında, eksplant olarak çoğunlukla steril kotiledon kullanılmaktadır. Ancak sera veya araziden alınan eksplant kullanımında ise bu eksplantların sterilizasyonuna ait tekniğin geliştirilmesi gerekmektedir. **Gray ve Elmstrom (1993)**, yaptıkları bir çalışmada, triploid hibrit tohum üretiminde kullanılan tetraploid genotiplerin mikroçoğaltımı için bir yöntem geliştirip patentlemiştir. Bu yöntemde, tetraploid olarak tanımlanan, arazi veya seradaki bitki gövdelerinden kesilen 2 cm'lik sürgün uçları, yüzey sterilizasyonu için sodyum hipoklorit çözeltisinde (%2.6 NaOCl + %1 aktifleştirici) 3 dakika bekletildikten sonra birkaç kez steril suda çalkalayarak sterilizasyonu gerçekleştirmişlerdir.

**Compton ve Gray (1992)**, seradan aldıkları 2 cm uzunluğundaki sürgünleri, %1.25 NaOCl çözeltisinde 5 dakika beklettikten sonra 6 kez steril distile suda çalkalayarak sterilizasyonu yapmışlardır.

Kullanılan bu sterilizasyon teknikleri, çalışmada geliştirdiğimiz tekniğe göre daha düşük konsantrasyonda NaOCl kullanımı sağlarken aynı zamanda sterilantta bekletme süresi bakımından da daha düşük bir süre içermektedir. Bu durum, farklı genotiplerde geliştirilen sterilizasyon tekniklerinin de farklı olabileceğini göstermiştir. Seradan alınan eksplantın sterilizasyonunda daha düşük sterilizasyon süresi (20 dakika) gerektiği, ancak aynı çeşidin

arazideki bitkisinden alınan eksplant için ise tamamen doğa şartlarında bulunduğu ve savunma mekanizmasının ortam şartlarına göre geliştiği için (örneğin sürgünlerin daha tüylü olması gibi) aynı konsantrasyonda ancak daha uzunca bir sterilizasyon süresine (40 dakika) ihtiyaç duyulduğu görülmüştür.

## 4.2. Kültür Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

### 4.2.1. Farklı Besi Ortamlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin sürgün proliferasyonuna MS, WPM ve SH besi ortamlarının etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Üç besi ortamına ait sürgün proliferasyon çalışması sonuçları Çizelge 10’da verilmiştir.

**Çizelge 10.** Sürgün proliferasyonuna MS, WPM, SH besi ortamlarının etkisi\*.

Besi ortamı tipi	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
MS	8.20 ± 0.52 a	1.77 ± 0.17 a
WPM	4.70 ± 0.25 b	0.63 ± 0.14 b
SH	2.60 ± 0.16 c	0.43 ± 0.05 b

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre sürgün sayısı bakımından MS besi ortamı ile diğer besi ortamları arasındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 10). Sürgün sayısı bakımından MS besi ortamında elde edilen  $8.20 \pm 0.52$  değeri, diğer besi ortamlarından daha yüksektir. Diğer iki grup arasında istatistiki olarak farklılık görülmüş ve en düşük sürgün sayısı  $2.60 \pm 0.16$  adet ile SH besi ortamından elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından ise SH ve WPM aynı istatistiki grupta yer aldığı görülmüştür. SH besi ortamı  $2.60 \pm 0.16$  cm’lik sürgün uzunluğu ile en düşük değere sahip olurken, MS besi ortamı,  $1.77 \pm 0.17$  cm ile en yüksek sürgün uzunluğuna sahip olmuştur.

### 4.2.2. MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin sürgün proliferasyonuna,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 ve 2 kuvvetlerinde hazırlanmış MS besi ortamlarının etkisi araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu elde edilen,

ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 11’de verilmiştir.

**Çizelge 11. Sürgün proliferasyonuna MS besi ortamının farklı kuvvetlerinin etkisi\*.**

Besi ortamı kuvveti	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
¼ MS	3.33 ± 0.33 c	0.29 ± 0.03 c
½ MS	4.25 ± 0.44 bc	0.40 ± 0.04 bc
Tam MS	8.20 ± 0.52 a	1.63 ± 0.22 a
2 MS	5.46 ± 0.75 b	0.44 ± 0.05 b

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Sürgün proliferasyon çalışmalarında MS besi ortamının kullanımı çok yaygındır. Ancak kullanılan bu besi ortamının değişik oranlarının etkisi de farklı olabilmektedir. Yapılan deneyde, sürgün uzunluğu bakımından tam MS besi ortamı ile diğer oranlar arasındaki fark önemli bulunmuştur. Tam kuvvette MS besi ortamı,  $8.20 \pm 0.52$  ile en yüksek sürgün uzunluğu değerine sahipken, ¼ kuvvetinin  $3.33 \pm 0.33$  sürgün sayısı ile en düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Sürgün uzunluğu bakımından ise, tam MS besi ortamı ile diğer oranlar arasındaki fark önemli bulunmuştur. Tam MS besi ortamı,  $1.63 \pm 0.22$  cm’lik sürgün uzunluğu ile en yüksek değere sahipken ¼ MS besi ortamı ise  $0.29 \pm 0.03$  cm sürgün uzunluğu ile oranlar arasında en düşük değere sahip olduğu görülmüştür. MS besi ortamının yoğunluğu azaldıkça sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda bir azalma olduğu görülmüştür. Bununla birlikte besi ortamı yoğunluğunun iki kat artırılması (2 MS) durumunda ise tam MS besi ortamı dışında kalan diğer yoğunluktaki besi ortamları ile aralarında istatistiki olarak beklenen artış değerini vermediği görülmüştür. 28 günlük kültür süresince tam MS besi ortamı kültürlerinin gelişimleri, diğer oranlardan daha iyi olduğu ve kullanılabilir sürgün vererek üstün performans gösterdiği morfolojik olarak da gözlemlenmiştir. Tam MS içeren kültürlerde sürgünlerin daha uniform olduğu, renklerinin diğer gruplara göre daha yeşil ve olgun olduğu da dikkati çekmiştir.



### 4.2.3. pH'nın Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, "Sürme" çeşidinin kotiledonlarından itibaren, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 pH değerlerinde hazırlanan besi ortamının sürgün gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda besi ortamının pH değeri, genelde 5.5'e ayarlanır. Ancak otoklavda sterilizasyon aşamasında pH değeri düşmektedir ve bundan dolayı sterilizasyon öncesi ve sonrası pH değerleri aynı kalmamaktadır. 28 günlük kültür sonucu, ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 12'de verilmiştir.

Sürgün sayısı bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur. pH 5.7 ve 5.8 aynı grupta yer almasına rağmen en yüksek değeri  $10.35 \pm 0.31$  ile pH 5.8 vermiştir. En düşük sürgün sayısı ise  $5.85 \pm 0.48$  değeri ile pH 5.9'da tespit edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından gruplar arasında istatistiki olarak farklılık görülmüştür. Sürgün uzunluğunda en yüksek değer,  $1.77 \pm 0.19$  cm ile pH 5.8'de ölçülmüştür. pH 5.5 ve 5.9 aynı grupta yer almasına rağmen, pH 5.5'in en düşük sürgün uzunluğuna ( $0.59 \pm 0.62$  cm) sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 12. Sürgün proliferasyonuna pH'nın etkisi\*

pH değerleri	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
5,5	$7.72 \pm 0.51$ b	$0.59 \pm 0.62$ c
5,6	$9.22 \pm 0.39$ ab	$0.71 \pm 0.14$ bc
5,7	$9.65 \pm 0.24$ a	$0.99 \pm 0.12$ b
5,8	$10.35 \pm 0.31$ a	$1.77 \pm 0.19$ a
5,9	$5.85 \pm 0.48$ c	$0.64 \pm 0.08$ c

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

Grupların sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı değerleri dikkate alındığında; pH 5.8 değeri diğer gruplara göre daha iyi performans göstermiştir. Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından besi ortamlarının pH değerleri arttıkça sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda artış olduğu gözlenmiştir. Ancak pH 5.9 değerinde olduğu gibi, üst değerlere çıkıldıkça sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda azalma olacağı düşünülmektedir. Sterilizasyondan sonra besi ortamının pH değerinde 1-2 derece düşüş olacağından, sterilizasyondan önce pH değerinin buna göre ayarlanması gerekmektedir.

#### 4.2.4. Agar Konsantrasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” kotiledonlarından itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine agarın 6, 7, 8, 9 ve 10 g l<sup>-1</sup> konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. MS basal besi ortamına, agar konsantrasyonlarının her serisi için 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, ilave edilmiştir. 28 günlük kültür sonucu, ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 13’te verilmiştir.

Sürgün sayısı bakımından test edilen gruplar arasında istatistiki olarak farklılık görülmüştür. Deneyde, 9.66 ± 0.70 sürgün sayısı ile 7 g l<sup>-1</sup> agar, diğer gruplardan daha yüksek değere sahiptir. 8 ve 9 g l<sup>-1</sup> agar gruplarında istatistiksel bir fark görülmemiştir 10 g l<sup>-1</sup> agarla destekli MS besi ortamında, 3.80 ± 0.45 sürgün sayısı ile en düşük oran elde edilmiştir. Agar konsantrasyonunun 7 g l<sup>-1</sup> üzerinde artmasıyla sürgün sayısının azaldığı görülmüştür.

Çizelge 13. Sürgün proliferasyonuna agar konsantrasyonunun etkisi\*.

Agar Konsantrasyonu g l <sup>-1</sup>	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
6	8.20 ± 0.32 b	2.19 ± 0.19 a
7	9.66 ± 0.70 a	2.34 ± 0.16 a
8	5.10 ± 0.45 c	1.50 ± 0.17 b
9	4.20 ± 0.46 c	0.91 ± 0.11 c
10	3.80 ± 0.45 d	0.88 ± 0.11 c

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

Agar konsantrasyonu 7 g l<sup>-1</sup> üzerine çıktıkça, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerlerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum yüksek konsantrasyonda kullanılan agarın, besi ortamını eksplantların faydalanmasına engel olacak kadar katılaştırdığı gözlenmiştir. Böylelikle istenilen seviyede ve kalitede sürgün gelişimi elde etmek zorlaşmaktadır.

#### 4.2.5. Şeker Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

“Sürme” kotiledonlarından itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine sakkaroz, glikoz, maltoz, dekstroz ve fruktoz şeker tiplerinin etkisi araştırılmıştır. Her grup için 28

günlük kültür sonucunda, ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 14’te verilmiştir.

Sürgün sayısı bakımından şeker tipleri arasında istatistiki olarak farklılık görülmüştür. Sakkaroz şeker tipi,  $7.83 \pm 0.62$  sürgün sayısı ile en yüksek değere sahip olup istatistiki olarak da diğer şeker tiplerinden farklı çıkmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından ise en yüksek değeri  $2.19 \pm 0.14$  cm ile sakkaroz vermiştir. Sakkaroz ile diğer gruplar arasında istatistiki olarak fark görülmüş fakat sakkaroz dışındaki şeker tiplerinin ise aynı grupta yer aldığı ve istatistiki olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

Dekstroz şeker tipi,  $0.19 \pm 0.02$  cm sürgün uzunluğu ile istatistiki açıdan diğer gruplarla aralarında fark olmamakla birlikte en düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Sakkaroz şeker tipinde, kültür süresince sürgünlerin gelişiminin oldukça muntazam olduğu ve diğer gruplara göre daha iyi gelişen sürgünler verdiği gözlenmiştir.

Çizelge 14. Sürgün proliferasyonuna şeker tipinin etkisi\*

Şeker tipi	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
Sakkaroz	$7.83 \pm 0.62$ a	$2.19 \pm 0.14$ a
Glikoz	$1.25 \pm 0.13$ c	$0.23 \pm 0.40$ b
Maltoz	$2.16 \pm 0.20$ b	$0.23 \pm 0.03$ b
Dekstroz	$1.75 \pm 0.21$ bc	$0.19 \pm 0.02$ b
Fruktoz	$1.83 \pm 0.16$ b	$0.21 \pm 0.03$ b

\*Kullanılan eksplant sayısı: 20

Maltoz şeker tipinde gelişim genelde zayıf olup kullanılabilir sürgün sayısı az olup boylarının da oldukça kısa olduğu gözlenmiştir. Fruktoz şeker tipi de maltoz ile aynı düzeyde gelişim göstermiştir. Sakkarozun dışındaki diğer tüm şeker tiplerinde gelişim aynı düzeyde olup kullanılabilir sürgün vermediği ve kotiledonlarda sararma olduğu gözlenmiştir.

#### 4.2.6. Sakkarozun Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, bir önceki deneyden elde edilen sonuç dikkate alınarak “Sürme” karpuz çeşidinin sürgün proliferasyonuna en uygun şeker tipi olan sakkarozun %1, %2, %3, %4, %6, %8 ve %10’luk konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu, ortalama

sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri istatistiksel uygulamalara tabi tutularak sonuçlar Çizelge 15'te verilmiştir.

Çizelgeki sonuçlar incelendiğinde; %2 ve %3'lük sakkaroz konsantrasyonları sürgün sayısı bakımından istatistiki olarak aynı grupta yer alarak aradaki fark önemli bulunmamıştır

**Çizelge 15.** Sürgün proliferasyonuna sakkarozun farklı konsantrasyonlarının etkisi\*.

Sakkaroz konsantrasyonu	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
Kontrol	1.66 ± 0.14 d	0.25 ± 0.05 d
%1	2.80 ± 0.32 c	0.24 ± 0.04 d
%2	6.80 ± 0.51 a	0.78 ± 0.37 b
%3	9.00 ± 0.81 a	2.45 ± 0.36 a
%4	5.60 ± 0.83 b	1.06 ± 0.25 b
%6	4.60 ± 0.87 b	1.05 ± 0.18 b
%8	3.90 ± 0.67 cb	0.46 ± 0.10 c
%10	4.00 ± 0.63 b	0.22 ± 0.05 d

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

Bununla birlikte %3'lük sakkaroz konsantrasyonunun,  $9.00 \pm 0.81$  adet sürgün ile en yüksek sürgün sayısına sahip olduğu görülmüş ve diğer gruplarla arasındaki fark önemli bulunmuştur. Kontrol grubu dışında ise en düşük sürgün sayısı;  $2.80 \pm 0.32$  değeri ile %1'lik sakkaroz konsantrasyonunda ölçülmüş ve diğer gruplarla arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından gruplar arasında farklılık görülmüş ve en yüksek sürgün uzunluğu,  $2.45 \pm 0.36$  cm ile %3'lük sakkaroz konsantrasyonunda ölçülmüştür. Ayrıca, %3'lük grup ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. En düşük değer,  $0.22 \pm 0.05$  cm ile %10 sakkaroz konsantrasyonundan elde edilmiş fakat bu grubun da kontrol ve %1 sakkaroz konsantrasyonuyla aynı istatistiki grupta yer aldığı görülmüştür. Kontrol grubunda sürgün proliferasyonunda gelişme sınırlı kalmış ve kültürün 5. gününden sonra ise vitrifikasyon görülmüş ve gelişmenin durduğu gözlenmiştir. Sürgün proliferasyonunda sakkaroz miktarının artmasıyla %3'lük konsantrasyonundan sonra beklenenin aksine düşüş olduğu gözlenmiştir. Sürgün proliferasyon çalışmalarında, kültürlerden oluşan sürgün sayısı kadar bu sürgünlerden kullanılabilir nitelikte sürgün eldesinin (yeteri uzunlukta, 1.5-2 cm) önemli bir faktör olduğu da bilinmektedir.

#### 4.2.7. Eksplant Tipinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde sürgün proliferasyon çalışmalarında kullanılacak eksplant tipini tespit etmek için materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi “Sürme” çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları (0.5 cm) ve bahçeden alınan sürgün uçları kullanılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait verileri istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 16’da verilmiştir.

Çizelge 16. Eksplant tipinin sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

Eksplant tipi	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
<b>Kotiledon</b>	8.40 ± 0.70 a	2.66 ± 0.20 a
<b>Bahçeden alınan</b>	3.10 ± 0.31 b	1.23 ± 0.26 b

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

Sürgün sayısı bakımından kotiledon ve bahçeden alınan eksplant arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. En yüksek sürgün sayısı 8.40 ± 0.70 ile kotiledondan elde edilmiştir. Bahçeden alınan eksplantın ise 3.10 ± 0.31 adet sürgün sayılmıştır (**Resim 6**).



Resim 6. Bahçeden Alınan Eksplantlarda Sürgün Proliferasyonu (bar: 10.7 mm).

Sürgün uzunluğu bakımından gruplar arasında istatistiki olarak farklılık görülmüştür. Kotiledondan elde edilen sürgün uzunluğu;  $2.66 \pm 0.20$  cm ile en yüksek değere sahipken bahçeden alınan eksplantan ise ortalama sürgün uzunluğu,  $1.23 \pm 0.26$  olarak ölçülmüştür. Bahçeden alınan eksplant kültür ortamında adeta küçük bir ağaç görünümü sergilerken sürgün proliferasyonu bakımından ise daha düşük bir performans sergilemiştir. Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri dikkate alındığında kotiledonun eksplant olarak kullanılmasında gelişim olarak bahçeden alınan eksplantta göre daha yüksek performans göstermiştir. Bahçeden eksplant temini her mevsim mümkün olmamaktadır. Fakat kotiledonun mevsime bağlı kalmaksızın her zaman bulunabilmesi, üstelik steril olarak kullanılabilmesi ve daha kaliteli sürgün vermesi gibi üstün özelliklerinden dolayı *in vitro* çalışmalarda tercih sebebi olmuştur.

#### 4.2.8. Eksplant Büyüklüğünün Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bir önceki deneyden elde edilen sonuç doğrultusunda eksplant olarak kotiledonların kullanılması uygun görülmüştür. *In vitro* çalışmalarda eksplant tipinin tercihi kadar kullanılan eksplantın büyüklüğü de önemlidir. Bundan dolayı, bu deneyde “Sürme” karpuz çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumların, kotiledonları hipokotilden itibaren 0.5, 1, 1.5 ve 2 cm uzunluğunda kesilerek sürgün proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilerek istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Deney sonuçlarına ait veriler Çizelge 17’de verilmiştir.

Çizelge 17. Eksplant büyüklüğünün sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

Eksplant büyüklüğü	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
0.5 cm	$9.38 \pm 0.53$ a	$2.14 \pm 0.21$ a
1 cm	$7.28 \pm 0.43$ b	$1.41 \pm 0.18$ b
1.5 cm	$6.42 \pm 0.52$ b	$1.16 \pm 0.10$ b
2 cm	$6.00 \pm 0.51$ b	$1.20 \pm 0.17$ b

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Sürgün sayısı bakımından gruplar karşılaştırıldığında, 0.5 cm’lik eksplant ile diğer gruplar arasında istatistiki olarak farklılık görülmüş ve en yüksek sürgün sayısı,  $9.38 \pm 0.53$  değer ile 0.5 cm’lik eksplanttan elde edilmiştir. Ancak 0.5 cm’lik eksplant dışındaki grupların



kendi aralarında istatistiki bir fark çıkmamış ve aynı grupta yer almalarına rağmen en düşük sürgün sayısı  $6.00 \pm 0.51$  değer ile 2 cm'lik eksplantlardan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından da benzer bir durum oluşmuştur. Yine 0.5 cm'lik eksplant grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Ortalama  $2.14 \pm 0.21$  cm sürgün uzunluğu ile 0.5 cm'lik eksplant grubunun en yüksek sürgün uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta, optimum eksplant boyutunun artmasının; sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda olumlu bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

#### 4.2.9. Işık Yoğunluğunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, "Sürme" çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna, 20, 30 ve 40  $\mu\text{mol}$  ışık yoğunluklarının etkileri araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda ışık yoğunluğu, kültürlerin yüksek performans göstermesi için optimum seviyede olması gerekmektedir. Deney sonunda 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerlerine ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

Çizelge 18. Işık yoğunluğunun sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

Işık yoğunluğu	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
Sürekli karanlık	$2.70 \pm 0.26$ c	$0.54 \pm 0.08$ c
20 $\mu\text{mol}$	$9.5 \pm 0.56$ a	$2.59 \pm 0.24$ a
30 $\mu\text{mol}$	$5.30 \pm 0.59$ b	$1.18 \pm 0.15$ b
40 $\mu\text{mol}$	$4.70 \pm 0.51$ b	$0.90 \pm 0.10$ b

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Kontrol grubundaki kültürler, büyüme odasında sürekli karanlık ortamda gelişmeye bırakılmıştır. Sürgün sayısı bakımından kültürler arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. En yüksek sürgün sayısı,  $9.5 \pm 0.56$  değer ile 20  $\mu\text{mol}$ 'dan elde edilmiştir. Kontrol grubundaki en düşük sürgün sayısı ise,  $2.70 \pm 0.26$  olarak hesaplanmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından en yüksek değer  $2.59 \pm 0.24$  cm ile yine 20  $\mu\text{mol}$  ışık yoğunluğunda elde edilmiştir. Kontrol grubunda ise  $0.54 \pm 0.08$  cm ile en düşük sürgün uzunluğu ölçülmüştür. Kültür ortamında ışık yoğunluğunun artmasıyla sürgün sayısı ve sürgün

uzunluğunda artış olmadığı görülmüştür. 30  $\mu\text{mol}$  ve 40  $\mu\text{mol}$  ışık yoğunluğundaki kültürlerden elde edilen sonuçlar aynı istatistiki grupta yer almış fakat 30  $\mu\text{mol}$  grubu daha kaliteli ve kullanılabilir sürgün verdiği gözlenmiştir.

#### 4.2.10. Kültür Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Değerlendirme

Karpuzun sürgün organogeneziyle ilgili olarak tüm raporlarda, kullanılan besi ortamı **Murashige ve Skoog (1962)** tarafından ana hatlarıyla formüle edilen makro ve mikro besin elementleri ve vitaminler olup çalışmamızda kullandığımız aynı yoğunluktaki besi ortamı bir çok araştırmacı tarafından da kullanılmıştır (**Srivastava ve ark., 1989; Dong ve Sia, 1991; Compton ve Gray, 1992; Compton ve ark., 1993; Choi ve ark., 1994; Choi ve ark., 1999; Compton, 1999, 2000; Chaturvedi ve Bhatnagar, 2001; Yalçın-Mendi ve ark., 2003**).

**Compton ve ark. (1992)**, diploid ve tetraploid karpuzların mikroçoğaltımına yönelik olarak yaptıkları çalışmada, MS besi ortamını kullanmışlardır. Yapılan çalışmada, diploid karpuzlarda, sürgün sayısı 6.2 ve sürgün uzunluğu ise 0.69 cm olarak bulunmuştur. Bu değerler bulgularımızdan her iki özellik açısından da düşük olmakla birlikte, özellikle sürgün uzunluğu bakımından elde ettiğimiz 1.77 cm'lik ortalama sürgün değeri ve 8.20 adet sürgün sayısı, MS besi ortamı çalışmalarından elde ettiğimiz bu değerler sürgün kalitesi için oldukça iyimser bir sonuçtur.

**Compton ve ark. (1993)**, diploid ve tetraploid karpuzlarda sürgün ucu için bir mikroçoğaltım yöntemini geliştirdikleri çalışmada, 21 günlük ve 1 cm uzunluğundaki bir nodlu sürgünleri materyal olarak kullanmışlardır. MS besi ortamına; 7 g  $\text{l}^{-1}$  agar, 30 g  $\text{l}^{-1}$  sakkaroz eklenmiştir. Besi ortamının pH'sı 5.7 olarak ayarlanmış ve kültürler 30-50  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  ışık kaynağına sahip büyüme odasına konulmuştur. Yapılan bu çalışmada, en iyi sürgün proliferasyonu, 6.2 adet sürgün sayısı ve 6.9 mm sürgün uzunluğu olarak ölçülmüştür. Araştırmamızda kültür koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yaptığımız ve aynı koşullarda elde ettiğimiz sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri **Compton ve ark.'nın (1993)**, değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Optimum ışık yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan deneyde, araştırmacıdan farklı olarak optimum ışık yoğunluğu 20  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. Bu deneye ait sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri sırasıyla; 9.50 ve 2.59 cm olarak bulunmuş ve bulgularımız araştırmacıların bulgularından daha yüksek çıkmıştır.

*In vitro* araştırmalarda, kotiledonların en iyi eksplant kaynağı olduğu ve tüm ya da yarım kotiledonların her ikisinin de eksplant olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (**Compton**

ve Gray, 1993a; Choi ve ark., 1994). Bununla birlikte özellikle rejenerasyon yeteneği düşük olan bazı çeşitlerde, tüm kotiledonlar kullanıldığında en iyi rejenerasyonu vermekte olduğu belirtilmiştir (Compton, 2000). 0.5-1.0 cm hipokotillerden de sürgün rejenerasyonu rapor edilmiş fakat rejenerasyon oranının düşük olduğu belirtilmiştir (Srivastava ve ark., 1989). Mikroçoğaltılan sürgünlerden, arazide yetiştirilen bitkilerden veya seradaki yapraklardan sürgün rejenerasyonu, klonal homojenlik için en çok beğenilen eksplant kaynağı olmasına rağmen yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu maalesef başarılmamıştır (Compton ve Gray, 1993a).

Elde ettiğimiz optimum pH değeri birçok araştırmacıyla (Alper ve ark., 1994 (pH, 5.7); Compton, 1999 (pH 5.8); Compton ve ark., 1996 (pH 5.7)) benzerlik göstermiş ve bulgularımız nisbeten daha yüksek bulunmuştur.

Çalışma sonunda bulunan 7 g l<sup>-1</sup> agar değeri *in vitro* çalışmalarda bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Karpuz kotiledon parçalarının katı ortamda, litreye 7-10 gr TC agar (Compton ve Gray, 1993a), 5 gr AgarGel (Compton, 1999) veya 4 gr Gelride (Choi ve ark., 1994) kùltürü yapıldığında en iyi rejenerasyonu vermektedir. Eksplantların sıvı ortamda inkübasyona alınması durumunda bitki rejenerasyonunu %75'ten %50'ye düşürmektedir.

Karpuz fidelerinin, mikroçoğaltılan sürgün uçları ve fide kotiledonların sürgün uçlarından rejenere olan adventif sürgünlerden elde edilmesi birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Anghel ve Rosu, 1985; Compton ve Gray, 1993; Dong ve ark., 1991; Srivastava ve ark., 1989; Yalçın-Mendi ve ark., 2003).

Compton (1999), embriyoların ışıkta ve karanlıkta çimlendirilmesinin kotiledonlarından itibaren sürgün organojenezisine etkisini tespit etmeye çalışmıştır. Yapılan bu çalışmada, 5 günlük kotiledonlar kullanılmıştır. Kùltür koşulları olarak; MS besi ortamı, 7 g l<sup>-1</sup> agar, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 1 mg l<sup>-1</sup> BA desteklenmiş ve pH'sı 5.8 olarak ayarlanıp karanlıkta ve ışıklı ortam olarak 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> floresan lambalar kullanılmıştır. Kùltür koşullarının optimizasyonuyla ilgili olarak elde ettiğimiz bulgular araştırmacının bulgularıyla uyum içerisinde dir.

### 4.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

#### 4.3.1. Sitokinin Tipi ve Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

##### 4.3.1.1. BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, Diyarbakır Sürme karpuz çeşidinin sürgün proliferasyon çalışmalarında, BA'in 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonları ile birlikte kontrol grubunun etkileri araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri rapor edilerek istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçları Çizelge 19'da verilmiştir.

Çizelge 19. BA'in farklı konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

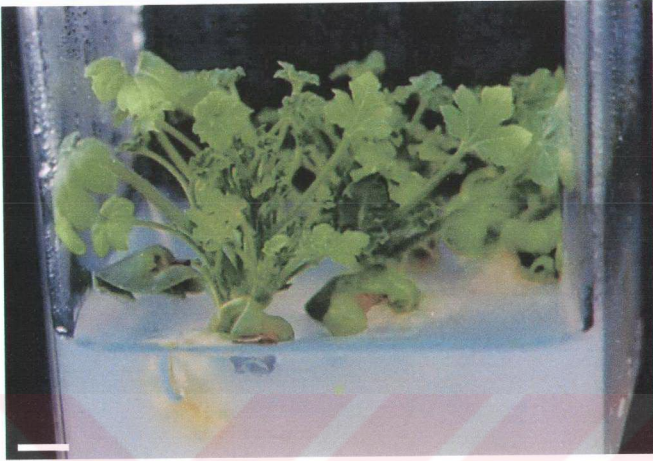
BA konsantrasyonu	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
Kontrol	1.50 ± 0.19 d	0.60 ± 0.09 c
0.5 mg l <sup>-1</sup>	8.46 ± 0.52 a	2.21 ± 0.22 a
1 mg l <sup>-1</sup>	6.26 ± 0.49 b	1.59 ± 0.25 ba
2 mg l <sup>-1</sup>	4.86 ± 0.40 c	1.42 ± 0.16 b
4 mg l <sup>-1</sup>	3.43 ± 0.36 c	1.15 ± 0.15 b
8 mg l <sup>-1</sup>	1.37 ± 0.15 d	0.53 ± 0.08 c
16 mg l <sup>-1</sup>	1.41 ± 0.19 d	0.44 ± 0.06 c

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Sürgün sayısı bakımından gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ve en fazla sürgün 8.46 ± 0.52 adet ile 0.5 mg l<sup>-1</sup> grubundan elde edilmiştir. 8 ve 16 mg l<sup>-1</sup> BA, kontrol grubuyla aynı istatistiki grupta yer almışlar fakat daha az sürgün sayısına sahip olmuşlardır. Sürgün uzunluğu bakımından da gruplar arasında istatistiki farklılık görülmüş ve en yüksek sürgün uzunluğu 2.21 ± 0.22 cm ile 0.5 mg l<sup>-1</sup> grubunda ölçülmüştür (**Resim 7**).

Sürgün sayısında olduğu gibi 8 ve 16 mg l<sup>-1</sup> grupları, kontrol grubuyla aynı istatistiki grupta yer almış fakat kontrolden daha kısa sürgünler elde edilmiştir. 28 günlük kültür süresince 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA'li ortamda gelişen kültürler diğer gruplara göre daha canlı görüldüğü ve sürgün gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Sürgün sayısının, sayılabilen değerden daha fazla olduğu fakat çok kısa oldukları için kullanılmayacak kalitede olduğu görülmüştür. Kültüre alınan eksplantın çok iyi bir gelişim sergilemiştir.





**Resim 7.**  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA İçeren Besi Ortamında Sürgün Proliferasyonu (bar: 6.6 mm)

Ayrıca,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA'li ortam,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  yakın bir gelişim sergilerken diğer gruplar ise daha düşük bir performans göstermişlerdir. Yüksek konsantrasyonlu BA ortamlarında ise sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerlerinde düşüş olduğu istatistiki olarak tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu BA içeren ortamlardaki sürgünlerde, boğum aralarında ve eksplantın kendisinde kültür sonunda kılma olduğu gözlenmiştir.  $8$  ve  $16 \text{ mg l}^{-1}$  BA ortamlarında sürgünlerde ve eksplantta bodur bir görünüm göze çarparken, yapraklarda kılmayla birlikte renk açılması ve tabanda kallus oluşumu dikkati çekmiştir.

#### **4.3.1.2. Kinetinin Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi**

Bu deneyde, "Sürme" çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna, kinetinin  $0.5$ ,  $1$ ,  $2$ ,  $4$ ,  $8$  ve  $16 \text{ mg l}^{-1}$  konsantrasyonlarının ve kontrol grubunun etkileri araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilmiştir. Kültürlere ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 20'de verilmiştir.

**Çizelge 20.** Kinetinin farklı konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonuna etkisi<sup>1</sup>.

Kinetin konsantrasyonu	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
<b>Kontrol</b>	1.50 ± 0.19 d	0.60 ± 0.09 b
<b>0.5 mg l<sup>-1</sup></b>	4.26 ± 0.35 a	1.39 ± 0.16 a
<b>1 mg l<sup>-1</sup></b>	4.88 ± 0.50 a	1.00 ± 0.12 a
<b>2 mg l<sup>-1</sup></b>	4.11 ± 0.33 a	1.57 ± 0.20 a
<b>4 mg l<sup>-1</sup></b>	2.72 ± 0.35 bc	0.90 ± 0.09 a
<b>8 mg l<sup>-1</sup></b>	2.17 ± 0.26 c	0.64 ± 0.07 ba
<b>16 mg l<sup>-1</sup></b>	1.50 ± 0.15 d	0.58 ± 0.06 b

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Sürgün sayısı bakımından gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Sürgün sayısı yönünden 0.5, 1 ve 2 mg l<sup>-1</sup> kinetin konsantrasyonları aynı istatistiki grupta yer almış ve aralarındaki fark önemsiz çıkmıştır. Aynı grupta yer almalarına rağmen 1 mg l<sup>-1</sup> kinetin konsantrasyonu 4.88 ± 0.50 adet sürgün ile tüm gruplar arasında en yüksek sürgün sayısına sahip olmuştur. En düşük sürgün sayısı (1.50 ± 0.15) ise kontrol grubu ile aynı istatistiki grupta yer alan 16 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilmiştir. Kinetin konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısı değerinde artış olmadığı ve olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Konsantrasyonlar arasında 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> değerleri aynı istatistiki grupta yer almalarına rağmen en yüksek sürgün uzunluğu, 1.57 ± 0.20 cm ile 2 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilmiştir. Kontrol grubu ve 16 mg l<sup>-1</sup> gruplarının diğer test edilen gruplara göre daha düşük sürgün uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sürgün proliferasyon çalışmalarında test edilen kinetin konsantrasyonlarının BA kadar etkili olmadığı görülmüştür. 1 mg l<sup>-1</sup> kinetin destekli MS besi ortamındaki bazı eksplantlarda köklenme olduğu gözlenmiştir.

“Sürme” çeşidinin sürgün proliferasyon çalışmalarında sitokin tipinin etkisini belirlemek için kullanılan BA ve kinetin farklı konsantrasyonları test edilmiştir. Yapılan çalışma sonunda BA'nin en yüksek performans gösteren konsantrasyonu 0.5 mg l<sup>-1</sup> olarak tespit edilirken; 8.46 ± 0.52 adet sürgün sayısı ve 2.21 ± 0.22 cm sürgün uzunluğu değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA'nin kinetin en yüksek sürgün proliferasyonu



gösteren konsantrasyonlarından daha yüksek sürgün proliferasyonu oluşturduğu Çizelge 19 ve Çizelge 20'den görülmektedir.

#### 4.3.2. BA'ya Oksin İlavesinin Sürgün Proliferasyonuna Ekisi

Bu deneyde, Diyarbakır Sürme karpuz çeşidinin *in vitro* ortamda sürgün proliferasyonuna, en iyi BA konsantrasyonuna ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA, IBA ve NAA ilavesinin etkileri araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilerek istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Kültürlere ait sonuçlar Çizelge 21'de verilmiştir.

Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından uygulamalar arasında her iki özellik açısından da farklılık görülmüştür.  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA grubunun diğerleriyle arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer iki gruplarla ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA ve  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA), her iki özellik yönünden istatistiksel olarak aynı grupta yer almış ve aradaki fark önemsiz çıkmıştır.

Çizelge 21. Uygun BA konsantrasyonuna oksin ilavesinin sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

BA + Oksin	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
$0.5 \text{ mg l}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ IAA	$5.06 \pm 0.49$ a	$2.00 \pm 0.18$ a
$0.5 \text{ mg l}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA	$3.61 \pm 0.31$ b	$1.13 \pm 0.14$ b
$0.5 \text{ mg l}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA	$3.14 \pm 0.23$ b	$1.05 \pm 0.13$ b

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

En yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri sırasıyla  $5.06 \pm 0.49$  ve  $2.00 \pm 0.18$  cm olarak,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA grubunda bulunmuştur. Her iki özellik için en düşük değerler sırasıyla  $3.14 \pm 0.23$  ve  $1.05 \pm 0.13$  cm ile diğer grupla aralarında istatistiksel fark olmamakla birlikte  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA grubundan elde edilmiştir. Sürgün proliferasyonu için uygun sitokinin konsantrasyonuna oksin ilavesi olumlu sonuç vermiş ancak yalnızca sitokinin kullanılması bir önceki deneyde de belirtildiği gibi daha yüksek performans göstermiştir.  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA'da en yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri sırasıyla;  $8.46 \pm 0.52$  cm ve  $2.21 \pm 0.22$  cm olarak ölçülmüştür. Sürgün proliferasyonunda,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA tek başına kullanıldığında  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA kullanımından daha yüksek performans gösterdiği tespit edilmiştir.

Kültür süresince  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA ortamındaki eksplantlarda taban kallusu oluştuğu fakat kök oluşturmadığı görülmüştür. Diğer iki gruba göre kültürlerin daha canlı görüldüğü ve sürgün kalitesinin daha iyi olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte diğer iki gruba ait kültürlerde de kallus oluştuğu gözlenmiştir.

#### 4.3.3. Eksplant Yaşının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının 5, 10, 15 ve 20 günlük kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna, etkileri araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilerek istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Deney sonuçları Çizelge 22’de verilmiştir.

Çizelge 22. Eksplant (kotiledon) yaşının sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

Eksplant yaşı	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
5 günlük	$9.70 \pm 0.47$ a	$2.50 \pm 0.17$ a
10 günlük	$6.60 \pm 0.47$ b	$1.34 \pm 0.17$ b
15 günlük	$7.40 \pm 0.60$ b	$1.10 \pm 0.10$ b
20 günlük	$7.80 \pm 0.75$ b	$1.28 \pm 0.12$ b

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Karpuzda sürgün proliferasyon araştırmalarında, eksplant olarak kotiledonun kullanılması kadar kotiledon yaşının da önemli olduğu bilinmektedir. Çizelge 22’den de görüldüğü gibi, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından uygulamalar arasında istatistiksel farklılık görülmüştür. Uygulamalardan 5 günlük kotiledon ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Her iki özellik açısından tüm uygulamalar iki istatistiki gruba ayrılmıştır. En yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri sırasıyla;  $9.70 \pm 0.47$  adet ve  $2.50 \pm 0.17$  cm ile 5 günlük kotiledon grubundan elde edilmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiki fark olmamakla birlikte, elde edilen değerler oldukça yüksektir. Sürgün sayısı bakımından en düşük değer,  $6.60 \pm 0.47$  adet ile 10 günlük kotiledondan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğunda ise en düşük değer;  $1.10 \pm 0.10$  cm ile 15 günlük kotiledon grubunda ölçülmüştür. Eksplant yaşının küçük olması sürgün proliferasyonuna olumlu etki göstermiş ve genç eksplant kullanımında organogenezis potansiyelinin yüksek olduğu izlenimini vermiştir.

#### 4.3.4. Altkültür Sayısının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak, oluşan sürgünler 4 haftalık kültür sonucu altkültüre alınmıştır. Yapılan 1., 2. ve 3. altkültürlerin sürgün proliferasyonuna, etkileri araştırılmıştır. Her altkültür (28 günlük) sonucu sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilmiş ve veriler istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 23’te verilmiştir.

Sürgün sayısı bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek değer,  $8.00 \pm 0.61$  ile 1. alt kültürden alınmış ve en düşük değer ise  $6.36 \pm 0.64$  ile 3. alt kültürden alınmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından gruplar arasındaki fark önemli çıkmış ve en yüksek sürgün uzunluğu  $1.84 \pm 0.21$  cm ile 1. alt kültürde ölçülmüştür. 3. altkültürün,  $1.07 \pm 0.48$  cm ile en düşük sürgün uzunluğu değerine sahip olduğu görülmüştür. Sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı bakımından, 1. altkültür diğer gruplara göre daha yüksek performans göstermiş olmakla birlikte, diğer gruplardan elde edilen sonuçlar da tatminkar görülmüştür.

Çizelge 23. Altkültür sayısının sürgün proliferasyonuna etkisi\*.

Altkültür sayısı	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
1. altkültür	$8.00 \pm 0.61$ a	$1.84 \pm 0.21$ a
2. altkültür	$8.07 \pm 0.84$ ab	$1.26 \pm 0.14$ ab
3. altkültür	$6.36 \pm 0.64$ b	$1.07 \pm 0.48$ b

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Mikroçoğaltım çalışmalarında mevsime bağlı kalmaksızın sürekli fide üretimi zamandan ve iş gücünden tasarruf olduğu gibi ana eksplant bulma açısından da büyük kolaylık sağlamaktadır. Böylelikle bir tek kotiledonun veya tohumun kullanılmasıyla 1. altkültürden ortalama 8 adet sürgün elde edilmesi ve bu sürgünler altkültüre alınarak (2. altkültür) bir sürgünden yine ortalama 8 adet sürgün elde edilmesi mümkündür. Elde edilen bu sürgünlerin tekrar altkültüre (3. altkültür) alınmasıyla bir sürgünden ortalama olarak 6 adet sürgün elde edilir. Yani 3 altkültür sonucu (63 günlük veya 80 günlük) bir sürgünden toplam;  $8 \times 8 \times 6 = 384$  adet sürgün elde etmek mümkündür. Bu sayı altkültür sayısı artırılarak daha

da yükseltilebilir. Böylelikle ana eksplant olarak kotiledonun tekrar tekrar kullanılması yerine altkültürü yapılan sürgünlerin kullanılmasıyla zamandan, iş gücünden ve ana eksplant kaynağından tasarruf edilmiş olunur. Altkültüre alma süresinin 4 haftada değil de 3 haftada bir olması ile, hesaplanan değerden daha yüksek performans elde edilmesi kaçınılmaz olur.

#### 4.3.5. Kültürde Bekletme Süresinin Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Bu deneyde, “Sürme” çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak sürgün proliferasyonuna, kültürde bekletme süresinin etkileri araştırılmıştır. Kotiledonlarından itibaren 3, 4 ve 5 hafta süreyle kültürde bekletilerek sürgün oluşumu gözlenmiştir. Farklı sürelerde bekletilen kültürlerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerlerine ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 24’te verilmiştir.

Çizelge 24. Sürgün proliferasyonuna kültürde bekletme süresinin etkisi\*.

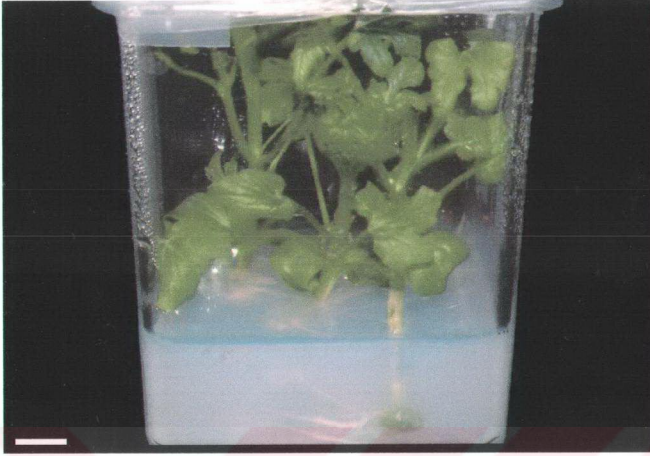
Kültürde bekletme süresi	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
3 hafta	7.85 ± 0.60 a	2.07 ± 0.19 a
4 hafta	6.70 ± 0.81 a	1.23 ± 0.16 b
5 hafta	6.90 ± 0.73 a	1.23 ± 0.23 b

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Bu deney sonucunda, sürgün sayısı bakımından kültürde bekletme süreleri arasında istatistiki fark bulunmamış ve tüm uygulamalar aynı grupta yer almıştır. Bununla birlikte en yüksek sürgün sayısı; 7.85 ± 0.60 adet ile 3 haftalık kültürlerde elde edilmiştir (**Resim 8**).

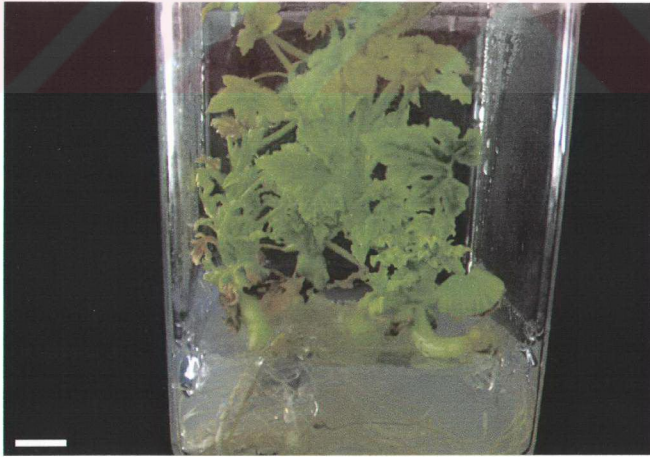
Sürgün uzunluğu bakımından ise kültürde bekletme sürelerinden 3 haftalık kültürler diğer iki gruptan farklı çıkmıştır. Sürgün uzunluğu, en yüksek 3 haftalık kültürlerden elde edilmiş ve 2.07 ± 0.19 cm olarak ölçülmüştür. Sürgün uzunluğu bakımından diğer iki grup arasında istatistiki fark olmadığından her iki grupta da 1.23 ± 0.16 cm olarak ölçülmüştür. Kültürde bekletme süresi mikroçoğaltım çalışmalarında bir önceki deneyde anlatıldığı gibi, zamandan, iş gücünden ve eksplanttan tasarruf sağlamaktadır. Ancak kültürde bekletme süresi eksplantın kültürde kaldığı sürece gelişme durumuyla yakından ilişkilidir. Eksplantın kültürde uzun süre bekletilmesi, gelişmenin ve dolayısıyla sürgün proliferasyonunun da olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır.





**Resim 8.** 3 Haftalık Kültürde Sürgün Proliferasyonu (bar: 10.9 mm).

Eksplantların kültürlerde kaldığı en uygun süre, optimum sürgün proliferasyonunun sağlandığı süredir. Ancak bu sürenin kısa olması mikroçoğaltımın tekerrürüne fırsat vermesi bakımından önemlidir. 5 haftalık kültürlerde zaman zaman sararma ve gelişmenin yavaşladığı gözlenmiştir (**Resim 9**).



**Resim 9.** 5 Haftalık Kültürde Sürgün Proliferasyonu (bar: 11.6 mm).

#### 4.3.6. Sürgün Proliferasyonu ile İlgili Değerlendirme

Sürme karpuzunun sürgün proliferasyon çalışmalarında eksplant olarak kotiledon kullanılması halinde daha yüksek sürgün proliferasyonu (eksplant başına  $8.40 \pm 0.70$  adet sürgün ve  $2,66 \pm 0,20$  cm ortalama sürgün uzunluğu) elde edildiği bir önceki bölümde ilgili deneyde açıklanmıştır. Bazı araştırmacılar eksplant olarak kullanılan kotiledonların uç kısımlarının (apikal uçlarının) genelde yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olduğunu belirtirken (Compton, 2000), bazıları (Compton ve Gray, 1993a; Choi ve ark. 1994) ise tüm kotiledon ya da yarım kotiledonların her ikisinin de eksplant olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte bazı çeşitlerde özellikle rejenerasyon yeteneği düşük olanlarda, tüm kotiledonlar kullanıldığında en iyi rejenerasyon elde edildiği bildirilmiştir ki; bu durum bulgularımızı destekler niteliktedir (Compton, 2000). “Sürme” çeşidinin tüm *in vitro* çalışmalarımızda eksplant olarak tam kotiledon kullanıldığı ve bu kotiledonların optimum 5 günlük olanlarının kullanılması halinde daha yüksek sürgün proliferasyonu elde edildiği (eksplant başına  $9.70 \pm 0.47$  adet sürgün sayısı ve  $2.50 \pm 0.17$  cm ortalama sürgün uzunluğu) ve eksplant yaşı ile ilgili yaptığımız deneyde belirtilmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgularımız bir çok araştırmacıyla benzer sonuçlar vermiş ve karpuz sürgün proliferasyon çalışmalarında, kotiledonların kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği ve 2-5 günlük fideliklerin kotiledonlarının en büyük organojenik yeteneğe sahip olduğunu bildirmişler (Compton ve Gray 1993a; Choi ve ark. 1994). Ayrıca, kotiledon eldesi için embriyoların ışıktaki veya karanlıkta çimlendirilebileceği fakat kotiledonların organojenik kabiliyetlerinin gelişmeleri karanlıkta çimlendirilen fidelerde daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Compton, 1999). Yaptığımız çalışmalarda tohumların çimlendirilmesi ise ışıklı ortamda gerçekleştirilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, Chaturvedi ve Bhatnagar, (2001), *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai cv. Sugar Baby için, *in vitro* rejenerasyon yöntemi geliştirmeye çalışmış ve eksplant olarak kotiledonları kullandıkları çalışmada, 7 günlük aseptik fidelerin en yüksek sürgün rejenerasyonunu verdiğini belirtmişlerdir. Kotiledon yaşının belirlenmesi için yaptığımız çalışmada da en yüksek proliferasyon, 5 günlük kotiledondan elde edilmiştir, bulgularımız araştırmacının bulgularıyla uyum içindedir. Niedz ve ark. (1989), kavunda yaptıkları çalışmada sürgün oluşumunun 4 veya 7 günlük fidelerden alınan kotiledonlarda, 18 günlük fidelerden alınan kotiledon veya yapraklardan daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.



Karpuz proliferasyon çalışmalarımızda sitokininlerin kullanılması gerektiği ve en uygun sitokininin BA olduğu tespit edilirken,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA'nın en uygun konsantrasyon olduğu bulunmuştur. Bulgularımız diğer araştırmacıların bulgularıyla uyum içerisinde olup, yapılan karpuz proliferasyon çalışmalarında,  $1-2 \text{ mg l}^{-1}$  BA kullanılması halinde optimum sürgün rejenerasyonun elde edildiği araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (Srivastava ve ark., 1989; Compton ve Gray 1993a; Choi ve ark., 1994; Jawarski ve Compton, 1997; Compton, 1999); Sitokininlere oksin ilavesinin sürgün proliferasyonuna etkisini araştırdığımız deneyde  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  IAA ilavesinin diğer oksinlere göre sürgün proliferasyonunu artırdığı ( $5.06$  sürgün sayısı ve  $2.08 \text{ cm}$  sürgün uzunluğu) ancak tek başına  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA kullanılması halinde ise sürgün proliferasyonun daha yüksek ( $8.46$  sürgün sayısı ve  $2.21$  sürgün uzunluğu) olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte Dong ve Jia, (1998),  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  IAA eklenmesiyle bazı genotiplerde eksplant başına düşen sürgün sayısını arttırdığını bildirmiş. Elde ettiğimiz bulgular araştırmacıyla özellikle IAA'nın eklenmesinin diğer oksin tiplerine göre daha iyi sonuç vermesi açısından uyum içerisinde. Araştırmamızın sonuçlarıyla uyum içerisinde olan bir diğer araştırmada Dabauza ve ark. (1997), *Citrullus colcyntis* (L) Schrad karpuzunun transformasyon çalışmalarında, eksplant olarak kotiledonları kullanmışlardır. Kotiledonların morfogenetikine hormonların etkisini test etmek için, tek başına BA ya da NAA veya IAA ile kombinasyonlarında MS besi ortamı kullanılmıştır. Bunlar arasında en iyi sonucu ise BA'nın tek başına kullanıldığı ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) ortam vermiştir. Elde edilen sürgünlerin uzaması için ise, uzama ortamı olarak,  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  BA'de sürgünler çok iyi gelişme göstermişlerdir. Araştırmamızda, BA'nın tek başına kullanıldığında daha iyi sonuç vermesi, araştırmacının bulgularıyla desteklenir niteliktedir.

Yalçın-Mendi ve ark. (2003), histolojik analizini yaptıkları Crimson Sweet karpuz çeşidinin rejenerasyonunda, eksplant olarak kotiledonları kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada kotiledonlar, BA ( $0, 1, 2, 4 \text{ mg l}^{-1}$ ) ve IAA ( $0, 1, 5 \text{ mg l}^{-1}$ ) kombinasyonları ile desteklenmiş ve MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. Maksimum sürgün gelişimi ve daha sonra da oluşacak köklenme oranları en yüksek  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA ve  $5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ortamında kültüre alınan eksplantlarda sırasıyla, %75 ve %78 olarak bulunmuştur. BA'li ortamda sürgün gelişiminin yüksek olması ve çalışmamızda da BA'li ortamda sürgün gelişiminin yüksek olması bakımından bulgularımız, araştırmacıların bulgularıyla uyum içinde olduğu görülmüştür.

Proliferasyon çalışmalarında kullandığımız diğer bir sitokin olan kinetin en iyi konsantrasyonunun,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  olduğu, ancak sürgün proliferasyonunun (sürgün sayısının 4,88 ve sürgün uzunluğu 1.00 cm) en iyi BA konsantrasyonu olan  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ den (sürgün sayısı 8.46 ve 2.21 sürgün uzunluğu) daha düşük olduğu bulunmuştur. Bulgularımız bir çok araştırmacıların bulgularıyla uyum içersindedir (**Dong ve Jia, 1991; Compton ve Gray, 1993a**). BA'nin yerine  $1 - 8 \text{ mg l}^{-1}$  kin., zea, 2İP ya da  $0.2 - 2 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ kullanılması halinde, sürgün gelişimini yavaşlattığını belirtmişlerdir.

**Compton (1999)**, embriyoların ışıқта ve karanlıkta çimlendirilmesinin kotiledonlarından itibaren sürgün organojenezisine etkisini tespit etmeye çalışmıştır. Yapılan bu çalışmada, 5 günlük kotiledonlar kullanılmıştır. Kültür koşulları olarak; MS besi ortamı,  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sakkaroz ve  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA desteklenmiş ve pH'sı 5.8 olarak ayarlanıp karanlıkta ve ışıklı ortam olarak  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  floresan lambalarının bulunduğu ortamlar kullanılmıştır. Kültürler 3 haftada bir altkültüre alınmıştır. Bu çalışmada, sürgünlere ait ölçümler 4 haftalık kültür sonunda alınmış olup 1.5-2 cm uzunluğunda ve vertikal aksile sahip sürgünler hasat edilebilir sürgün olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, karanlıkta çimlendirilen embriyolardan oluşan sürgün oranı ışıқта çimlendirilenlerden oluşan sürgün oranından daha yüksek bulunmuştur. Sürme karpuzu için yaptığımız sürgün proliferasyon çalışmasında, kültür koşulları araştırmacının koşullarıyla aynı olduğu, sürgün proliferasyonunu artırmak için kullanılan sitokininin BA olduğu, fakat konsantrasyonunun farklı olduğu görülmüştür. Altkültüre alınma zamanı olarak çalışmamıza 4 haftalık periyotlar halinde altkültür çalışmaları yapılırken araştırmacı ise 3 haftalık periyotlarda yapmıştır. Ancak, araştırmamızda, kültürlerin morfolojik görünüşleri, altkültür çalışmalarının 3 haftalık periyotlarla yapılabileceği izlenimi vermiştir. Bununla birlikte yaptığımız bir başka deneyde optimum kültürde kalma süresinin 3 hafta olduğu ve bu kültürlerden elde edilen sürgün proliferasyonunun daha yüksek olduğu ( $7.85$  sürgün sayısı ve  $2.07$  cm sürgün uzunluğu) tespit edilmiştir. Bulgularımızın araştırmacının bulgularıyla uyum içinde olduğu görülmüştür.

**Compton ve Gray (1992)**, triploid ve tetraploid karpuzların hızlı bir çoğaltımı için mikroçoğaltım tekniğini geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada; 1 cm uzunluğundaki sürgünler, MS besi ortamı,  $7 \text{ g l}^{-1}$  agar,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sakkaroz  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  BA ortamında (ışık gücü olarak  $30-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) gelişmeye bırakılmış ve 3 haftalık periyotlarla altkültüre alınmışlardır. Araştırmamızdaki, kültür koşulları araştırmacının kültür koşullarıyla uyum

içerisinde olup, BA'nin uygun sitokininin olması ve kültürde kalma süresinin 3 hafta olması bakımından benzerlik göstermiştir.

**Compton ve ark. (1993a)**, karpuzun mikroçoğaltımı için geliştirdiği genel yöntem kullanılarak, 6 ay gibi bir sürede, başta 100 sürgün ucu ile yapılan *in vitro* kültürden yaklaşık 1.2 milyon bitki elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Araştırma bulgularımız doğrultusunda yaptığımız çalışmada ise 3 ay gibi bir sürede bir sürgünden ortalama 384 adet bitki elde edileceği, bunun 6 aylık bir süre için ise tahmini olarak;  $384 \times 6 \times 6 = 13824$  adet bitki elde edileceği bulunmuş, 100 eksplantla kültüre başlanması halinde ise;  $13824 \times 100 = 1\ 382\ 400$  adet bitki elde edileceği hesaplanmıştır. Elde edilen bu değer araştırmacının bulgularından daha yüksek çıkmıştır.

**Compton ve Gray (1994)**, tetraploid karpuz kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada 4 farklı hibrit hat (F92U8, SP90-1, SP90-2 ve SP90-4) kullanmışlardır. Bu hatlar olgun tohumlardan veya 2, 4, 6, 8 veya 10 günlük fidelerden elde edilmiştir. Eksplantlar önce 8 hafta sürgün rejenerasyon ortamında ve bunu izleyen 4 haftalık sürgün uzama ortamında inkübasyona alınmışlardır. Sürgün proliferasyonunda, MS besi ortamı  $30\text{ g l}^{-1}$  sakkaroz,  $7\text{ g l}^{-1}$  agar ve  $0.25\text{ mg l}^{-1}$  BA ile desteklenmiş ve tüm ortamlarda pH 5.7 değeri kullanılmıştır. İki günlük kotiledonlardan elde edilen F92U8 ve SP90-2 hatlarında en yüksek sürgün oluşum frekansı sırasıyla %66 ve %60 olarak bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı eksplant kaynağının yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. En fazla sürgün oluşumu, 2 ve 4 günlük fidelerden alınan eksplantlarda görülürken 4 günlük ve daha yaşlı bitkilerden alınan eksplantlar ise daha az sayıda sürgün oluşturduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da 5 günlük kotiledonların daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Kotiledon yaşının artışıyla sürgün proliferasyonunda azalma olduğu görülmüş olup bulgularımız araştırmacının bulgularıyla benzerlik göstermiştir.

**Anghel ve Rosu (1985)**, diploid, triploid ve tetraploid karpuz genotipleriyle yaptıkları çalışmada, sürgün oluşumu için kotiledonların, inkübasyonunda yalnız  $1-2\text{ mg l}^{-1}$  BA veya  $0.1-0.4\text{ mg l}^{-1}$  2,4 D,  $0.3\text{ mg l}^{-1}$  IAA veya  $0.2\text{ mg l}^{-1}$  IBA ile birlikte desteklenmiş MS besi ortamının olduğunu belirtirken sürgün proliferasyon çalışmamızda BA'nin iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

**Compton ve Gray (1993)**, diploid, triploid ve tetraploid karpuz kotiledonlarından sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, MS besi ortamının  $1\text{ ve }2\text{ mg l}^{-1}$  BA ile desteklenmesiyle, kinetinin ( $4\text{ mg l}^{-1}$ ) ve thidiazuronun ( $0.2\text{ mg}$

$l^{-1}$ ) en iyi konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında en yüksek sürgün oluşturan eksplant oranının ve eksplant başına sürgün sayısının elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı diploidlerde, (%37 ve 2.2) triploid (%22 ve 0.6) ve tetraploidlere (%20 ve 0.8) göre daha yüksek bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı ise en yüksek 5 günlük kotiledonların kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir. Yani genç fidelerden alınan eksplantların (kotiledon) kullanılması halinde, sürgün oluşumunun daha fazla olacağını belirtmişlerdir.

**Compton ve ark. (1993).** diploid ve tetraploid karpuzlarda sürgün ucu için bir mikroçoğaltım yöntemini geliştirdikleri çalışmada, 21 günlük ve 1 cm uzunluğundaki bir nodlu sürgünleri materyal olarak kullanmışlardır. MS besi ortamına; 7 g  $l^{-1}$  agar, 30 g  $l^{-1}$  sakkaroz eklenmiştir. Sürgün proliferasyonu için BA, TDZ ve kin. kullanmışlardır. Besi ortamının pH'sı 5.7 olarak ayarlanmış ve kültürler, 30-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğuna sahip büyüme odasına konulmuştur. Altkültür sayısının sürgün proliferasyonuna ve köklenmeye etkisini test etmek için kültürler 4 haftalık periyotlarla 6 ay boyunca altkültüre alınmışlardır. Yapılan bu çalışmada, en iyi sürgün proliferasyonu, 1 mg  $l^{-1}$  BA ortamında 6.2 adet sürgün sayısı ve 6.9 mm sürgün uzunluğu (diğer sitokininlerden 1.5-2.8 kat daha fazla) elde edilmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısında 3. ve 4. altkültürlerde bir azalma olduğu fakat ilk iki altkültürde artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada 3 ay gibi bir sürede 250 materyalden 13 200 adet bitki üretilmesi mümkündür. Benzer sonuçlar elde ettiğimiz çalışmamızda, altkültürlerde sürgün proliferasyonunun azalması ve en iyi sitokinin tipinin BA olarak bulunması araştırmacıyla uyum içerisinde olduğumuz bulgular olarak değerlendirilmiştir. Ancak en iyi BA konsantrasyonunda (0.5 mg  $l^{-1}$ ) elde edilen sürgün sayısı; 8.46 ve sürgün uzunluğu olarak 2.21 cm ortalama uzunluk araştırmacının bulgularından daha yüksek çıkmıştır.

#### 4.4. Rejenerantları Köklendirme Çalışmaları

##### 4.4.1. Oksinlerin Köklenmeye Etkileri

###### 4.4.1.1. IAA'nın Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, "Sürme" çeşidinin *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarının kotiledonları kullanılarak proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin köklendirme çalışmaları yapılmıştır. Deneyde IAA'nın 0.5, 1, 2 ve 4 mg  $l^{-1}$  konsantrasyonlarının köklenmeye etkisi



araştırılmıştır. Kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranı rapor edilmiş ve istatistik analiz sonuçları Çizelge 25'te verilmiştir.

Çizelge 25. IAA'nın köklenmeye etkisi\*.

IAA konsantrasyonu	Kök sayısı	Kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
Kontrol	0.15 ± 0.05 b	0.10 ± 0.05 b	10
0.5 mg l <sup>-1</sup>	2.16 ± 0.65 a	0.21 ± 0.4 ba	20
1 mg l <sup>-1</sup>	1.87 ± 0.5 a	0.20 ± 0.04 a	30
2 mg l <sup>-1</sup>	1.42 ± 0.42 a	0.33 ± 0.03 a	40
4 mg l <sup>-1</sup>	1.14 ± 0.14 a	0.18 ± 0.04 a	30
$\chi^2$ (df 4)			P > 0.01

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Kök sayısı bakımından kontrol grubu dışında diğer gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda kök sayısı yok denecek kadar az olup, tabanda topuz şeklinde bir görünüm sergilemiş, sürgün oluşumu ve gelişiminin olmadığı görülmüştür. Kök sayısı bakımından konsantrasyonlar arasında istatistiki fark olmamakla birlikte en yüksek kök oluşumu 0.5 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonunda ortalama 2.16 ± 0.65 adet olarak sayılmıştır. En düşük değer ise, 1.14 ± 0,14 adet ile 4 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonunda sayılmıştır. Kök uzunluğu bakımından kontrol grubu dışında yalnızca 0.5 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonu diğer gruplardan istatistiki olarak farklı çıkmıştır. 1. 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> IAA konsantrasyonları arasında istatistiki bir fark olmayıp hepsi de aynı grupta yer almış olmalarına rağmen en yüksek kök uzunluğu 2 mg l<sup>-1</sup> grubunda 0.33 ± 0.03 cm ortalama kök uzunluğu ölçülmüştür. Bu gruplardaki eksplantların mevcut sürgünlerinde sararma ve bazen de vitrifikasyon görülmüştür. 1 ve 2 mg l<sup>-1</sup> IAA konsantrasyonlarında ise bazı kültürlerde tabanda kallus benzeri oluşum izlenmiştir. Köklenme oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık olmadığı görülmüştür (P>0.01). Tüm grupların köklenme oranları oldukça düşük düzeyde oluşmuş ve kültür süresince gelişmelerinin de zayıf olduğu gözlenmiştir.

#### 4.4.1.2. IBA'nın Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyonundan elde edilen sürgünlere IBA'nın farklı konsantrasyonlarının, köklenmeye etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla köklenmeye elverişli

sürgünler IBA'nın 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonlarını içeren ortamda kültüre alınmışlardır. Kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranı rapor edilmiş ve istatistik analiz sonuçları Çizelge 26'da verilmiştir.

Çizelge 26. IBA'nın köklenmeye etkisi\*.

IBA konsantrasyonu	Kök sayısı	Kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
Kontrol	0.15 ± 0.05 c	0.10 ± 0.05 c	10
0.5 mg l <sup>-1</sup>	1.50 ± 0.37 ab	0.20 ± 0.02 b	20
1 mg l <sup>-1</sup>	1.14 ± 0.14 b	0.21 ± 0.01 b	40
2 mg l <sup>-1</sup>	2.25 ± 0.75 a	0.54 ± 0.14 a	40
4 mg l <sup>-1</sup>	2.25 ± 0.53 a	0.24 ± 0.04 b	35
$\chi^2$ (df 4)			P > 0.01

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Kök sayısı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> gruplarında kök sayısı bakımından istatistiksel fark olmamakla birlikte 2 mg l<sup>-1</sup> 2.25 ± 0.75 adet kök ile en fazla köke sahip grup olduğu tespit edilmiştir. Kök uzunluğu bakımından ise konsantrasyonlar arasında istatistiksel fark önemli bulunmamıştır. 2 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonunda 0.54 ± 0.14 cm ortalama kök uzunluğu ile en yüksek kök uzunluğu ölçülmüştür. Köklenme oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmemiştir (P>0.01). Köklenen eksplant yüzdesi olarak, 1 ve 2 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonlarının eşit köklenme oranlarına (%40) sahip olup en yüksek değeri göstermişlerdir. Köklenme oranları tüm gruplarda düşük olarak değerlendirilmekte ve optimum bir köklenme oranını belirlemek mümkün görünmemektedir.

Gruplar arasında, 0.5 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonu içeren kültürlerde yeni sürgün gelişiminin olmadığı ve tabanda kallus benzeri topuz şeklinde yapının olduğu gözlenmiştir. 1 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonu içeren ortamda ise tabanda kallus oluşumuyla birlikte kök benzeri yapının görüldüğü ve yeni sürgünlerin olduğu izlenmiştir. Bu grup 0.5 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonuna göre daha iyi sonuç vermiş, ancak yeterli olmadığı görülmüştür. 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültürlerin gelişimleri benzerlik göstermekte; kök oluşumları diğer gruplara göre daha belirgin, yeni sürgün oluşumu iyi ve canlı olup kallus benzeri oluşum çok düşük seviyededir.



#### 4.4.1.3. NAA'nın Köklenmeye Etkisi

Deneyde NAA'nın 0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonlarının köklenmeye etkisi araştırılmıştır. Kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranı rapor edilerek istatistik analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 27'de verilmiştir.

**Çizelge 27.** NAA'nın köklenmeye etkisi\*.

NAA Konsantrasyonu	Kök sayısı	Kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
Kontrol	0.15 ± 0.05 d	0.10 ± 0.05 c	10
0.5 mg l <sup>-1</sup>	1.16 ± 0.16 c	0.32 ± 0.04 b	40
1 mg l <sup>-1</sup>	2.87 ± 0.63 a	1.05 ± 0.14 a	70
2 mg l <sup>-1</sup>	1.62 ± 0.49 b	0.58 ± 0.01 a	60
4 mg l <sup>-1</sup>	1.00 ± 00 c	0.28 ± 0.06 b	30
$\chi^2$ (df 4)			P < 0.01

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Kök sayısı bakımından test edilen konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En fazla kök sayısı, 2.87 ± 0.63 adet ile 1 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilmiş ve bu değer ile diğer gruplarla arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kök sayısı bakımından en düşük değer, 1.00 ± 00 adet ile 4 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Kök uzunluğu bakımından ise tüm gruplar arasında istatistiki fark anlamlı bulunmuştur. Kök uzunluğu itibariyle en yüksek değer; 1.05 ± 0.14 cm ile 1 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilirken en düşük kök uzunluğu ise 0.32 ± 0.04 cm ile 0.5 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonunda ölçülmüştür.

Köklenme oranları bakımından test edilen gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Köklenen eksplant yüzdesi olarak gruplar arasında en yüksek köklenme oranı; %70 olarak 1 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan elde edilirken en düşük oran ise kontrol grubundan sonra 4 mg l<sup>-1</sup> NAA konsantrasyonunda %30 olarak elde edilmiştir. NAA konsantrasyonu arttıkça köklenme oranı 2 mg l<sup>-1</sup> konsantrasyonundan sonra artmayıp azaldığı görülmüştür.

Tüm özellikler açısından ve istatistik analiz sonuçları dikkate alınarsa 1 mg l<sup>-1</sup> NAA konsantrasyonu en iyi sonucu vererek yüksek performans göstermiştir. Bu gruba ait kültürlerin genel gelişimi çok iyi görünmekte ve eksplantın kendisi de iyi bir gelişme göstermiş ve yeni sürgünler vermiştir. Kök oluşumunun %40'ı 4. günde oluşmaya başladığı 7. günde daha belirgin olduğu ve 14. günde ise kazık köklerin oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca kallus oluşumunun diğer gruplar kadar yoğun olmadığı gözlenmiştir. Sürgün ve yaprak oluşumunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve kültürün sonuna kadar canlılıklarını devam ettirerek vitrifikasyon oluşumunun çok az olduğu gözlenmiştir. Bu gruba en yakın gelişim 2 mg l<sup>-1</sup> NAA konsantrasyonunda olduğu görülmüş ancak bu grupta vitrifikasyon ve taban kallus oluşumunun; 0.5 ve 4 mg l<sup>-1</sup> NAA gruplarındaki kadar yoğun olmasa da görülmüştür.

Köklenme çalışmalarında en iyi oksin tipini ve optimum konsantrasyonunu belirlemek için incelenen tüm özellikler açısından genel bir değerlendirme yapılması gerekmektedir. Her oksin tipinin kendi içinde en iyi performans gösteren konsantrasyonuna ait veriler ayrı ayrı yapılan deneylerde verilmiştir. Tüm oksin grupları içinde en iyi sonucu 1 mg l<sup>-1</sup> NAA konsantrasyonu vermiştir (**Resim 10**). Bu grup tüm özellikler açısından ve kültür süresince gelişme durumu bakımından diğer oksin grupları ve konsantrasyonları arasında gösterdiği performans nedeniyle iyi sonuç vermiştir. Her oksin tipi farklı genotiplerde aynı sonucu veremeyeceği ve dolayısıyla her genotip için optimum oksin tipi ve konsantrasyonu da farklı olacaktır.

#### 4.4.2. Altkültür Sayısının Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* şartlarda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin köklenmesine, altkültür sayısının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, 1., 2. ve 3. altkültürden elde edilen ve köklenmeye elverişli olan sürgünler kullanılmıştır. Kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranı rapor edilmiş ve istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Sonuçlar Çizelge 28'de verilmiştir.

Sürgün proliferasyon çalışmalarında altkültür sayısının sunduğu avantajların köklenme çalışmalarında da geçerli olduğunu söylemek mümkündür. Altkültür grupları arasında kök sayısı bakımından istatistiksel bir fark olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte en fazla kök oluşturan grup; ortalama  $1.66 \pm 0.28$  adet ile 1. altkültürde olduğu görülürken en düşük kök oluşumu ise 2. altkültürde ortalama  $1.42 \pm 0.29$  adet olarak sayılmıştır. Yani oluşan kök sayısına, altkültür sayısının herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.



Resim 10. 1 mg l<sup>-1</sup> NAA'dan Elde Edilen Köklü Fideler (bar: 33.0 mm).

Çizelge 28. Altkültür sayısının köklenmeye etkisi\*.

Altkültür sayısı	Kazık kök sayısı	Kazık kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
1. Altkültür	1.66 ± 0.28 a	1.50 ± 0.10 a	90
2. Altkültür	1.42 ± 0.29 a	0.82 ± 0.15 b	75
3. Altkültür	1.44 ± 0.24 a	1.88 ± 0.26 a	80
$\chi^2$ (df 2)			<b>P &gt; 0.01</b>

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Kök uzunluğu bakımından altkültür sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. 1. ve 3. altkültürler aynı istatistiksel grupta yer almış olmalarına rağmen en yüksek kök uzunluğu 3. altkültürden ortalama 1.88 ± 0.26 cm olarak ölçülmüştür. 2. altkültür istatistiksel olarak, 1. ve 3. altkültürlerden farklı grupta yer almış ve en düşük kök uzunluğu ortalama 0.82±0.15 cm ile bu grupta ölçülmüştür.

Köklenme oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmamıştır (P>0.01). Ancak altkültürlerin köklenme yüzdelerine ait ortalama değerler incelendiğinde ise en yüksek köklenme oranı, % 90 ile 1. altkültürlerden elde edilmiştir. Köklenme yüzdesinin

en düşük oranı ise % 75 ile 2. altkültürlerden elde edilmiştir. Köklenme oranları bakımından istatistiksel farklılık olmamakla birlikte elde edilen sonuçlar kullanılabilir niteliktedir. Alt kültür sayısı arttıkça köklenme oranlarında bir düşüş olduğu ancak bunun önemsenmeyecek düzeylerde kaldığı söylenebilir. Tüm köklenme özellikleri açısından en yüksek performansı 1. altkültürlerin verdiği görülmüştür. Çünkü köklenme yüzdesinin en yüksek seviyede olması ve kök sayısının diğer gruplarla aynı istatistiki seviyede olmasına rağmen en yüksek bu grupta sayılmıştır. Kök uzunluğu bakımından 3. altkültürle aynı istatistiki grupta yer almış fakat daha düşük değere sahip olduğu ancak diğer iki özellik yönünden 3. altkültürden üstün olması ve köklenme çalışmalarında özellikle köklenme yüzdesinin yüksek olmasının en önemli kriter olduğu dikkate alınırsa, 1. altkültürün diğer gruplardan daha üstün olduğu ve köklenme çalışmalarında kullanılabileceği görülmüştür.

Kültür süresince 1. altkültürde sürgün oluşumu ve kök gelişiminin diğer kültürlerle göre daha iyi performans gösterdiği, gelişen sürgünlerde vitrifikasyon olmadığı ve çok sayıda adventif kök verdiği gözlenmiştir. Ayrıca 2. altkültürde bazı eksplantlarda kallus benzeri yapının oluştuğu ve topuz şeklinde kök oluşumlarına ve bunlardan da kısa kısa adventif köklere rastlandığı, fakat 3. altkültürde ise bu oluşumların daha az olduğu dikkat çekmiştir.

#### 4.4.3. Eksplant Tipinin Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, eksplant tipi olarak köklenmeye elverişli nodal ve apikal segmentlerin köklenme ortamlarındaki performansları araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranlarına ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 29'da verilmiştir.

Çizelge 29. Eksplant tipinin köklenmeye etkisi\*.

Eksplant tipi	Kazık kök sayısı	Kazık kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
Apikal	2.09 ± 0.41 a	0.86 ± 0.11 b	68
Nodal	2.91 ± 0.45 a	1.33 ± 0.14 a	82
$\chi^2$ (df 2)			P > 0.01

\* Kullanılan eksplant sayısı: 20

Kök sayısı bakımından eksplant tipleri arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır. Eksplant tipleri istatistiki olarak aynı grupta yer almalarına rağmen en fazla kök

sayısı ortalaması,  $2.91 \pm 0.45$  adet ile nodal eksplant tipine ait köklerde sayılmıştır. Kök uzunluğu bakımından her iki eksplant tipi istatistiki olarak farklı gruplarda yer almışlardır. En yüksek kök uzunluğu ortalama değeri;  $1.33 \pm 0.14$  cm ile nodal eksplant tipinde ölçülmüştür. Köklenen eksplant oranları açısından gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.01$ ). Bununla birlikte en yüksek köklenme oranı, % 82 ile nodal eksplantlardan elde edilirken apikal eksplantlarda ise köklenme oranı, %68 olarak bulunmuştur. Köklenme oranları bakımından nodal sürgünlerin gelişimleri de iyi sonuç vermiş ve elde edilen sonuç oldukça tatminkar bulunmuştur. Tüm özellikler açısından nodal eksplantların apikal eksplantlara göre daha yüksek performans göstermesi ve özellikle de köklenme oranının yüksek olması ve sürgün proliferasyon çalışmalarında nodal eksplantların sayıca daha fazla olması önemli tercih sebepleridir.

#### 4.4.4. Karanlık İşleminin Köklenmeye Etkisi

Bu deneyde, sürgünlerin köklenmesini hızlandırmak için köklenme ortamına alınan sürgünlerde, 3, 5, 7 gün ve sürekli karanlık uygulamalarının köklenme üzerine etkisi araştırılmıştır. 28 günlük kültür sonucu ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen eksplant oranı rapor edilmiş ve istatistik analiz sonuçları Çizelge 30'da verilmiştir

Çizelge 30. Karanlık işleminin köklenmeye etkisi\*.

Karanlıkta kalma süresi	Kazık kök sayısı	Kazık kök uzunluğu (cm)	Köklenen eksplant (%)
3 gün	$2.80 \pm 0.41$ a	$1.18 \pm 0.13$ a	33
5 gün	$2.40 \pm 0.42$ ab	$1.54 \pm 0.15$ a	67
7 gün	$3.50 \pm 0.65$ a	$1.55 \pm 0.19$ a	87
Sürekli	$1.14 \pm 0.14$ b	$0.68 \pm 0.09$ b	67
$\chi^2$ (sd 3)			<b>P &lt; 0.01</b>

\* Kullanılan eksplant sayısı:20

Kök sayısı bakımından süreler arasında istatistiki fark anlamlı bulunmuştur. 7 gün karanlıkta bekletilen kültürlerde ortalama  $3.50 \pm 0.65$  adet kök sayısı ile en fazla kök oluşturan grup olmuştur. En düşük kök oluşumu ise  $1.14 \pm 0.14$  adet ile sürekli karanlıkta bırakılan gruptan elde edilmiştir. Karanlıkta kalma süresi arttıkça oluşan kök sayısında bir artış olduğu ancak bu artışın 7 günden sonra azaldığı görülmüştür. Kök uzunluğu bakımından



karanlıkta kalma sürelerinde istatistiki fark olmadığı ve tüm kültürlerin aynı grupta yer aldığı görülmüştür. Kök uzunluğunda en yüksek değer  $1.55 \pm 0.19$  cm ile 7 gün karanlık süresinde belirlenmiş, en düşük değer ise  $0.68 \pm 0.09$  cm ile sürekli karanlıkta kalan kültürlerde ölçülmüştür. Köklenme oranları bakımından test edilen gruplar arasında istatistiksel farklılık anlamlı bulunmuştur ( $P>0.01$ ). Gruplar arasında en yüksek köklenme oranı, %87 ile 7 gün karanlıkta bırakılan kültürlerden elde edilirken, en düşük oranı ise %33 ile 3 gün karanlıkta hesaplanmıştır. Karanlıkta kalma süresi arttıkça köklenme oranı artmış ancak, optimum karanlık seviyesinden (7 gün) sonra karanlıkta kalmanın bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Tüm gruplar, üç özellik açısından değerlendirildiğinde özellikle de köklenen eksplant oranı bakımından en iyi performansı, 7 gün karanlık süresinin gösterdiğini söylemek mümkündür. Karanlıkta kalma süresi, oksinlerin karanlıkta daha aktifleşerek hücre bölünmesini artırıp hızlandığı ve daha etkili olduğu söylenebilir. Bu durum eksplantların köklenmesini ve kök oluşturmaya hızlandığı ve optimum karanlıkta kalma süresinin belirlenmesiyle daha da etkin olacaktır. Sürekli karanlıkta (28 gün) kalan eksplantlarda; köklenme ile ilgili veriler elde edilmiş olsa da bu değerler karanlıkta bırakılan ilk günlerde elde edildiği ancak daha sonra eksplantın genelinde vitrifikasyon ve gelişmede durgunluk olduğu, sürgün gelişiminin çok az ve cılız olduğu, taban kısmında kallus benzeri yapının olduğu gözlenmiştir. 7 gün karanlık süresinde eksplantın gelişimi kadar oluşan kök sayısı ve kök uzunluğunda da iyi sonuç alınmıştır. Oluşan kökler diğer gruplara göre daha belirgin ve uzun olup diğerlerinde olduğu kadar taban kallusuna rastlanmamıştır. Ayrıca sürgünler daha canlı ve yeşil olup eksplantın boyunda da uzama olduğu (13 cm) tespit edilmiştir. 5 günlük karanlık süresinde morfolojik görünüm ve gelişim, 7 gün kadar iyi olmayıp kök gelişiminin daha zayıf olduğu görülmüştür. 3 günlük karanlıkta ise taban kallusunun olduğu kök kısmının topuz şeklinde olduğu, bununla birlikte ince ve cılız köklerin olduğu, sürgün gelişiminin çok az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca eksplantın kendisinde de gelişmenin zayıf olduğu dikkat çekmiştir. Tüm gruplar arasında en iyi performansı; 7 gün karanlıkta kalan kültürler göstermiştir.

#### 4.4.5. Rejenerantların Köklendirilmesi ile İlgili Değerlendirme

Karpuz köklenme çalışmalarında farklı oksin tiplerinin farklı konsantrasyonları kullanıldığı bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Compton ve ark., 1993a; Dong ve Jia, 1991; Dabauza ve ark., 1997; Compton ve ark., 2001; Piriç ve ark., 2003).



Rejenerantların köklendirilmesi çalışmasında kullanılan oksin tipleri arasında en uygun oksin tipinin ve konsantrasyonunun 1 mg l<sup>-1</sup> NAA olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada en yüksek köklenme oranı 1 mg l<sup>-1</sup> NAA ortamında, %70 olarak bulunmuştur. **Compton ve ark. (1993a)**, 1 mg l<sup>-1</sup> BA veya 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA ortamına aktarılan sürgünlerin yaklaşık olarak %70-90'ının kök oluşturduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz köklenme oranı (1 mg l<sup>-1</sup> NAA'da, %70 ve 1. altkültürde ise %90) araştırmacının bulgularıyla uyum içindedir. **Gray ve Elmstrom (1991)**, köklenme çalışmalarında sürgünlerin en az 2 cm olduklarında kolayca köklendiklerini belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, IBA'nın köklenmede yetersiz olduğu görülmüştür. Ancak **Compton ve Gray (1993a)**, 15 mm'den daha büyük sürgünleri, 2 mg l<sup>-1</sup> IBA'da köklendiklerini belirtirken, **Dong ve Jia, (1991)**, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA'lı ortamda sürgünlerin kolay köklenebildiklerini belirtmişlerdir. Diğer kabakgöl türleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (**Compton ve ark., 2001**). Araştırmacıların bulguları, NAA'nın en uygun oksin olması açısından bulgularımızla uyum içersindedir.

**Dabauza ve ark. (1997)**, *Citrullus colcynthis* (L) Schrad karpuzunun transformasyon çalışmalarında, eksplant olarak kotiledonları kullanmışlardır. Araştırmada; kotiledonların morfogeneğine hormonların etkisini test etmek için, tek başına BA ya da NAA veya IAA kombinasyonları kullanılmıştır. Sürgünlerin köklenmesi için ise sürgünler 0.5 veya 1 mg l<sup>-1</sup> IBA ortamına aktarılmış ve köklenmenin bu ortamda sağlandığını belirtirken araştırmamızda NAA'nın optimum köklenme vermesi, bakımından bulgularımız farklı çıkmıştır.

**Compton ve Gray (1993)**, diploid, triploid ve tetraploid karpuz kotiledonlarından sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada; köklenme ortamı olarak, 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 2 mg l<sup>-1</sup> NAA ile desteklenmiş MS besi ortamı kullanılmıştır. En yüksek köklenme oranları ise diploidlerde %94, triploidlerde ve tetraploidlerde %100 olarak bulunmuştur. Köklenme çalışmalarımızda, 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz kullanılırken araştırmacı tüm köklenme çalışmalarında 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz kullanmıştır. Ancak NAA'nın en uygun oksin olması bakımından bulgularımız benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda 7 gün karanlıkta bırakılan kültürlerde bu oran %87 olarak bulunmuş bu değer araştırmacının bulgularıyla göstermiştir.

Karanlıkta bırakmanın köklenme üzerine etkisinin belirlenmesi için yaptığımız çalışmada, kültürlerin 7 gün karanlıkta bırakılması halinde köklenmenin arttığı tespit edilirken, yapılan literatür çalışmamızda *in vitro* karpuz sürgünlerinin köklenmesinde böyle

bir uygulamaya rastlanmamıştır. Ancak bazı araştırmacılar (**Evans ve ark. 1981; Hartmann ve ark. 1997**), tohumların karanlıkta çimlendirilmesi halinde sürgün proliferasyonunun arttığını fakat karanlıkta bekletmenin etkisinin ne olduğu tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bitki dokularının karanlıkta inkübasyonu; ışığa duyarlı bazı bitki büyüme düzenleyicilerini ve diğer bileşikleri koruduğunu bildirmektedirler.

**Pirinç ve ark. (2003)**, diploid Süreme çeşidinin kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada, *in vitro* köklenme ortamında MS besisi ortamının, NAA (1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup>) ile desteklenmiş ve 30 g l<sup>-1</sup> sakaroz kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmada, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA konsantrasyonunun %70 köklenme oranıyla en yüksek sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz en yüksek köklenme oranı 1 mg l<sup>-1</sup> NAA'da %70 olarak bulunmuştur. Bulgularımız araştırmacının bulgularıyla uyum içinde olup destekler niteliktedir. Ancak köklenme ortamına aktarılan kültürlerin 7 gün süreyle karanlıkta kalması halinde köklenme oranını %87'ye çıkardığı yaptığımız çalışma sonunda bulunmuştur. Araştırmacının, köklenme için kültürleri karanlık ortamda bırakmadığı ve dolayısıyla bu özellik açısından bulgularımız araştırmacının bulgularından daha yüksek çıkmıştır.

**Compton ve ark. (1993)**, karpuzun doku kültüründe sürgün çoğaltım çalışmalarında, 1.6 cm'den büyük sürgünlerin yeterli bir aklimatizasyon ve rizogenezis (%90-100) gösterdiğini fakat 1.6 cm'den küçük sürgünlerin ise daha düşük (%55) köklenme ve aklimatizasyon gösterdiğini bildirmektedir. Yaptığımız tüm köklenme çalışmalarında, 1.5 cm'den büyük sürgünler kullanılmıştır. Köklenme oranı ise genotipe ve kültür süresine bağlı olarak; %60 ile %100 arasında olmuştur. Yapılan bu çalışmayla sürgün ucunun 6 aya kadar köklenme oranları ve aklimatizasyon oranlarında önemli bir azalma olmaksızın altkültürünün yapılabileceği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada, 1., 2. ve 3. altkültür rejenerantların köklenme oranlarında az da olsa bir düşüş (sırasıyla,%90, %75 ve %80) olmuştur. Aynı araştırmacı (**Compton ve ark., 1994**), diploid karpuz kotiledonlarından tetraploid bitki rejenerasyonu için yapılan çalışmada, yeni sürgünler, diploid Micky Lee karpuz çeşidi kotiledonlarının 6 haftalık sürgün proliferasyon ortamına aktarılmasından elde edilmiştir. Bu bitkiler 1-2 cm uzunluktaki sürgünlerin, 2 mg l<sup>-1</sup> IBA köklenme ortamına aktarılmasıyla elde edildiğini belirtmişlerdir.

**Compton ve Gray (1992)**, triploid ve tetraploid karpuzların hızlı bir çoğaltımı için mikroçoğaltım tekniğini geliştirmişlerdir. Sürgün proliferasyon ortamında gelişen kültür 3

haftalık periyotlarla altkültüre alınmışlardır. Bu ortamdan gelişen 5-30 mm uzunluğundaki sürgünler, 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 1 mg l<sup>-1</sup> IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında köklenmeye alınmışlardır. Tetraploid kültürlerde ise en yüksek sürgün sayısı, köklenme oranı ve aklimatize edilen bitki oranı değerleri sırasıyla; 5.2, %88.9 ve %68.9 olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada, 1 mg l<sup>-1</sup> NAA kullanılmış ve köklenme oranı %70 olarak bulunmuştur. Bulgularımız araştırmacının bulgularından daha düşük çıkmıştır. Ancak rejenerantları 7 gün karanlıkta beklettiğimizde ise köklenme oranının arttığı (%87) görülmüştür. Bu değer araştırmacının bulgularıyla benzerlik gösterirken altkültürün köklenmeye etkisinin araştırdığı deneyde ise 1. altkültürde köklenme oranı %90 bulunmuştur.

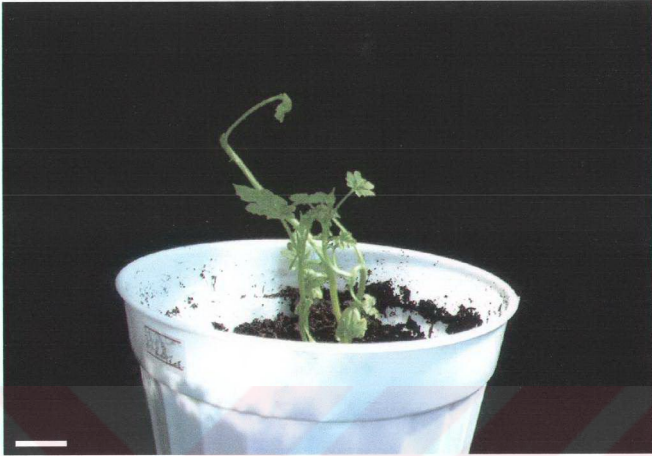
**Compton ve Gray (1994)**, tetraploid karpuz kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, 4 farklı hibrit hat (F92U8, SP90-1, SP90-2 ve SP90-4) kullanılmıştır. Bu hatlar olgun tohumlardan veya 2, 4, 6, 8 veya 10 günlük fidelerden alınan eksplantlarla sürgün elde etmişlerdir. Köklenmede ise, MS besi ortamı 20 g l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7g l<sup>-1</sup> agar ve 2 mg l<sup>-1</sup> IBA ile desteklenmiştir.

#### 4.5. Aklimatizasyon

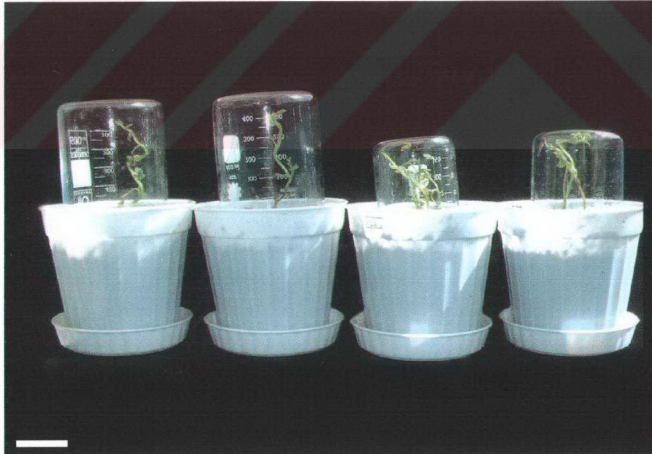
Bitki doku kültürü çalışmalarında, eksplantın *in vitro*'da sağlıklı bir şekilde geliştirilmesi kadar *in vitro*'dan çıkarılıp araziye aktarılınca kadar geçen süre içinde sağlıklı olması da en az *in vitro* süreci kadar önemlidir. Köklenmiş sürgünlerin veya fideliklerin aseptik koşullardan doğal şartlara alıştırılması için yapılan işlemlerin geneli ve bu süreç *aklimatizasyon* olarak adlandırılmaktadır (**Resim 11, 12, 13, 14**).

Aklimatizasyon çalışmasında substrat olarak torf kullanılmıştır. Kullanılan torfun köklenmeye ya da aynı zamanda yaşayan fidelere etkisini tespit etmek için yapılan deney sonuçları Çizelge 31'de verilmiştir.

Yaşayan eksplant oranları bakımından test edilen gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur (p<0.01). En yüksek yaşayan eksplant oranı, %86 ile tam steril substrattan elde edilmiştir. Yani substratın steril edilip kullanılması yaşayan fide sayısını artırmıştır. Ancak steril edilmeyen substratta ise yaşayan fide oranı, %6.66 olarak gruplar arasında en düşük olup; bu gruptaki fidelere sağlıklı bir gelişme göstermemiştir. Kullanılan substratın steril olarak kullanılması yaşayan fide sayısını artırmıştır.

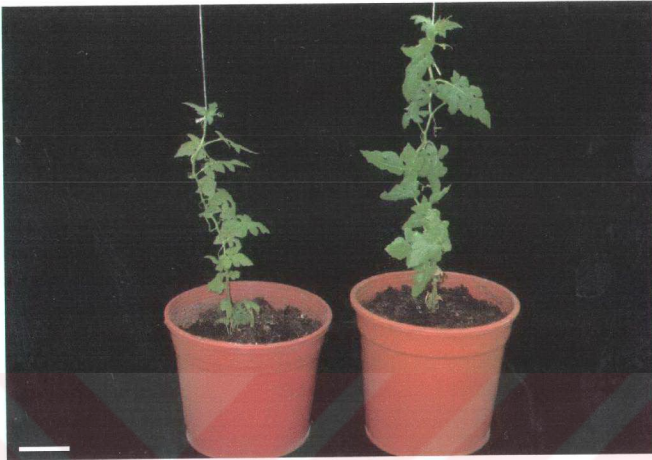


*Resim 11. Aklimatizasyondan Çıkarılmış Fide (bar: 17.1mm)*



*Resim 12. Aklimatizasyona Alınmış Fideler (bar: 43.3 mm).*





*Resim 13. Doğal Őartılara Aktarılmış Fideler (bar: 40.6 mm)*



*Resim 14. Araziye Aktarılmış In Vitro Fide*

Çizelge 31. Substrat sterilizasyonunun aklimitasyona etkisi\*

Kompost tipi	Yaşayan eksplant (%)
Tam steril substrat	86.60
Yarı steril substrat	20.00
Non-steril substrat	6.66
$\chi^2$ (df 2)	P < 0.01

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

#### 4.5.1. Aklimatizasyon ile İlgili Değerlendirme

**Compton ve ark. (1993a)**, 1 mg l<sup>-1</sup> BA veya 2 mg l<sup>-1</sup> NAA ortamına aktarılan sürgünlerin yaklaşık olarak %70-90'ının kök oluşturduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz köklenme oranı araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermiştir. Köklenen bu fideciklerden %60-85'i seraya ve arazi şartlarına aklimatizasyon göstermiş ve aklimatizasyonda kullanılan substrat olarak sterilize edilmiş vermikulit olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise aklimatize edilen fide oranı, %86 olarak bulunmuş ve substrat olarak da sterilize edilmiş torf kullanılmıştır. Aklimatizasyonda kullanılan substratın sterilize edilerek kullanılması ve aklimatize edilen bitki oranı bakımından bulgularımız araştırmacının bulgularıyla uyum içinde olduğu görülmüştür.

Yapılan tüm aklimatizasyon çalışmalarında kullanılan substrat farklı bile olsa sterilize edilerek kullanıldığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (**Sarı, 1994; Compton ve ark., 1993a; Compton ve Gray, 1994; Dabauza ve ark., 1997; Piriñç, 2003**).

**Piriñç ve ark. (2003)**, diploid Sürme çeşidinin kotiledonlarından adventif sürgün organojenezisi ve bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada, *in vitro* köklenme ortamından alınan fidecikler, sterilize edilmiş torf içeren saksılarda aklimatizasyonu yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada, aklimatizasyon için kullanılan yöntem, araştırmamızda kullanılan yöntemle aynı içeriklere sahiptir.

#### 4.6. Tetraploid Oluşturulması

Karpuz ıslahında, tetraploidlerin kullanımı önemli bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Çekirdeksiz karpuz elde etmede triploid eldesi kadar, etkin tetraploid oluşturulması da önemlidir bundan dolayı tetraploid oluşturulmasına yönelik olarak değişik



metodlar kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılan kolşisin uygulaması ise pratik olması açısından tercih edilmektedir. Kullanılan bu metod kadar uygulanan materyalin kendisi de etkin bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Tetraploid oluşturulmasına yönelik olarak yapılan uygulama; tarlada kolşisin uygulanarak tetraploid oluşturulması ve tohuma kolşisin uygulanarak tetraploid oluşturulması sayılabilir. Her iki uygulamaya yönelik olarak yapılan kloroplast sayımına ait sonuçlar ploidi seviyesinin belirlenmesi başlığı altında verilmiştir.

#### 4.6.1. Tarlada Kolşisin Uygulaması

Tarlada kolşisin uygulaması çalışmasında bitkilerin büyüme ucları 24 saat süreyle %0.2'lik kolşisin çözeltisiyle muamele edilmiştir. Kolşisin uygulaması sonucu, tetraploid oluşum kloroplastların sayılması ile tespit edilmiştir. Tetraploid bitkilere ait kloroplast sayısına ait veriler 7. bölümde ploidi seviyesinin belirlenmesi başlığı altında verilecektir. Tetraploid oluşumların belirlenmesinde kesin olmamakla birlikte bazı bitkisel özelliklerde değişimler olmaktadır. Bunların başında yaprak uzunluğu ve yaprak genişliği sayılabilir. Tetraploid ve diploid bitkilerde, yaprak uzunluğu ve yaprak genişliğine ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 32'te verilmiştir.

Çizelge 32. Diploid ve tetraploid bitkilerde ölçümler<sup>\*</sup>.

Bitkiler	Yaprak uzunluğu (cm)	Yaprak genişliği (cm)	Bitki boyu (cm)
Diploid bitki	18.41 ± 2.92 a	13.71 ± 2.53 a	274.80 ± 36.76 a
Tetraploid bitki	15.46 ± 2.16 a	16.55 ± 20.8 a	203.60 ± 11.92 b

\*Kullanılan eksplant sayısı:20

Yaprak uzunluğu bakımından gruplar arasında istatistiki fark olmadığı görülmüştür. Tetraploid bitki yapraklarında, istatistiksel farklılık olmamakla birlikte diploid bitki yapraklarından daha kısa olduğu görülmüştür. Yaprak genişliği bakımından ise gruplar arasında istatistiksel farklılık olmadığı ancak tetraploid bitki yapraklarının, diploid bitki yapraklarına göre daha geniş olduğu tespit edilmiştir. Tetraploid bitkilerde yaprak uzunluğu, 15.46 ± 2.16 cm, yaprak genişliği ise 16.55 ± 20.8 cm olarak ölçülmüştür. Diploid bitki yapraklarında ise yaprak uzunluğu 18.41 ± 2.92 cm, yaprak genişliği ise 13.71 ± 2.53 cm olarak ölçülmüştür. Tetraploid yaprakların kesin olmamakla birlikte diploid yapraklara göre daha kısa olabileceği fakat yaprak genişliğinin ise benzer ölçülerde veya bazen daha geniş

olabileceği bilinmektedir. Bu gibi durumlar, tetraploid oluşumunun bitkide morfolojik görüntüsü olarak kendini belli etmektedir. Tetraploid oluşumunda kullanılacak bir diğer faktör ise bitki boyudur. Bitki boyu bakımından iki grup arasındaki istatistiksel farklılık önemli çıkmıştır. Yapılan istatistik analiz sonucuna göre diploidlerde bitki boyu,  $274.80 \pm 36.76$  cm olarak ölçülürken tetraploidlerde bitki boyu ortalaması ise  $203.60 \pm 11.92$  cm olarak bulunmuştur. Tetraploid oluşumun görüldüğü durumlarda bitki boylarının daha kısa olabileceği bilinmektedir. Tüm üç özellik açısından değerlendirme yapıldığında, kolşisin uygulamasının tetraploid oluşumunda etkili olduğu ve bunun da bitki morfolojisindeki değişime yansıdığı görülmüştür. Ancak daha belirleyici olması için ploidi seviyesinin tespit edilmesi daha kesin sonuç verecektir.

#### 4.6.2. Tohuma Kolşisin Uygulaması

Tetraploid oluşum için kullanılan bir diğer uygulama ise tohumlara farklı sürelerde (8, 16 ve 24 saat) kolşisin uygulanmasıdır. Tohumlara farklı sürelerde kolşisin uygulamasına ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 33'te verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel farklılık önemli çıkmıştır ( $p < 0.01$ ). Gruplar arasında 8 saat ve 16 saat kolşisin uygulaması aynı istatistiki grupta yer alırken, tüm gruplar içerisinde en düşük kloroplast sayısı;  $9.8 \pm 1.38$  adet ile 8 saat kolşisin uygulamasından elde edilmiştir. Bununla birlikte 8 ve 16 saat kolşisin uygulamalarında kloroplast sayısı diploid kloroplast sayısı ile bezerlik gösterdiğinden tetraploid oluşumun olmadığı görülmüştür. En yüksek kloroplast sayısı ise 24 saat kolşisin uygulamasından;  $16.95 \pm 0.75$  adet olarak sayılmıştır. Bu durumda, 24 saat kolşisin uygulamasının tetraploid oluşumunda etkin olduğu tespit edilmiştir. Uygulama süresinin artmasıyla kloroplast sayısında artış olduğu diğer bir ifade ile tetraploid oluşumuna doğru gidildiği fakat bunun için en uygun sürenin 24 saat olduğu görülmüştür.

Çizelge 33. Tohuma, farklı sürelerde kolşisin uygulaması\*.

Uygulama süresi	kloroplast sayısı
8 saat	$9.8 \pm 1.38$ b
16 saat	$10.90 \pm 2.88$ b
24 saat	$16.95 \pm 0.75$ a

\*Kullanılan eksplant sayısı: 20

Bu yönteme ait veriler, tetraploid oluşturulması çalışmalarında kullanılan diğer yöntemlere ait verilerle birlikte karşılaştırmak için, "Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi" başlığı altında analiz edilmiştir.

#### 4.6.3. Teraploid Oluşturulması ile İlgili Değerlendirme

Çekirdeksiz karpuz üretilmesinde, bitkiye ve tohuma kolşisin uygulaması bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, tohuma ve bitkiye kolşisin uygulanarak tetraploid olduğu ancak uygulama süresinin ve dozun etkili olduğu bilinmektedir.

**Lower ve Johnson (1969)**, Hindistan'da tetraploid karpuz hatları elde edebilmek amacıyla fidelerin büyüme noktalarına veya tohumlara kolşisin uygulaması yapmışlardır. Çalışmada Charleston Gray 133 ve Princeton çeşitlerine;

- Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 24 saat içinde 2 damla %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 52 saat içinde 8 damla %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- Kotiledon yapraklı aşamadayken büyüme uçlarına 80 saatte %0.3'lük kolşisin damlatılması,
- Ekimden önce tohumların 6-24 saat (6 saat aralıklarla) %0.1-%0.2 kolşisin çözeltisine bandırılması işlemleri uygulanmıştır.

Araştırma sonucunda, Princeton çeşidi tetraploidiye Charleston Gray 133'e göre daha iyi yanıt vermiştir. Bu çeşitte 8 damla kolşisin uygulaması (52 ve 80 saatte) %6 oranında tetraploid uyarımı sağlarken; C. Gray çeşidinde bu oran %4 düzeyinde bulunmuştur. 2 damla (24 saat) kolşisin uygulaması Charleston Gray çeşidinde hiç yanıt vermezken; Princeton çeşidinde %3 düzeyinde tetraploidi oluşturmuştur. Tohumların 24 saat %0.1'lik veya 18 saat %0.2'lik kolşisine bandırılması %0-20 oranlarında tetraploidi oluşturmuştur. Araştırmacılar tohum bandırma yönteminin büyüme ucuna damlatmaya göre daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Tetraploid bitkilerin diploidlerden daha geniş ve tüylü yapraklı, iri çiçekli ve sülüklü olması gibi değişik morfolojik gözlemlerin olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada, tohumların, %0.02 kolşisinde 24 saat bekletilmesinde tetraploid olduğu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada tohuma uygulanan kolşisin konsantrasyonunun (%0.02), bitkide büyüme ucuna uygulanan konsantrasyondan (%0.2) daha düşük olduğu ve araştırmacı da tohuma uygulanan kolşisin dozunu bitkiye uygulanan dozdan daha düşük kullanmıştır.



Ayrıca araştırmacı tohuma uyguladığı kolşisin dozunun (%0.1 ve %0.2) uygulamamızdan daha yüksek, fakat uygulama süresinin (24 ve 18) uygulama süremizden daha az veya aynı olduğu görüldüğünden bulgularımız uyum içindedir. Bununla birlikte, araştırmamızda 24 saat tohum uygulamasında tetraploid oluşum oranı verilmemekle birlikte oldukça yüksek olup tetraploid oluşumu, araştırmacının bulgularından daha yüksek çıkmıştır. Tarlada büyüme uçlarına uyguladığımız kolşisin dozu (%0.2), araştırıcının dozundan (%0.3) daha düşük fakat 24 saat süreyle uygulamanın araştırmacının farklı sürelerde uygulamasına göre tetraploid oluşum bakımından bulgularımız daha iyi sonuç vermiştir. Tetraploid bitkilerde yaprak ölçümlerimiz diploid yapraklara göre daha geniş olup farklılık göstermiştir. Bu özellik açısından araştırmacının bulguları, bulgularımızı destekler niteliktedir.

**Karchi ve ark. (1983)**, İsrail koşullarında tetraploid Alena ile ebeveyni Sugar Baby çeşitlerinde morfolojik gelişim ve verimlilik durumlarını incelemek üzere bir deneme yapmışlardır. Denemede, Alena'nın Sugar Baby'den 20 gün daha sonra çiçeklendiği, çiçeklenme aşamasında bitkisinin Sugar Baby'den daha küçük olduğu; Sugar Baby'nin yarısı kadar dal oluşturduğu; boğum sayısının Sugar Baby'nin %65'i kadar olduğu, ana gövde ile yan kol uzunluklarının Sugar Baby'nin yarısı kadar olduğu saptanmıştır. Bu nedenle Alena çeşidinin uyartıcı uygulamalara ihtiyacı olduğunu belirleyen araştırmacılar fazla miktarda üst gübreleme yapmışlardır. Üst gübreleme uygulaması ile gerek meyve ağırlığı, gerek bitki başına meyve sayısı, gerekse verim önemli ölçüde yükselmiş ve ebeveyni Sugar Baby'e yaklaşmıştır. Bulgularımızda tetraploid bitkilerin boyunun (203.60 cm) diploidlere (274.80 cm) göre daha kısa olduğu görülmüş olup bulgularımız, araştırmacının bulgularıyla uyum içindedir.

**Dore (1976)**, kuşkonmaz (*Asparagus officinalis L.*) türünde elde edilmiş olan haploid bitkilerde kromozom katlaması yapmıştır. Araştırıcı, *in vitro* besi ortamına kattığı farklı kolşisin dozlarında ( $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$ ) haploid meristemleri farklı sürelerde (1, 2, 3, 4, 5 ve 6 gün) tutmuş ve bu süreler sonunda meristemleri normal besi ortamına alarak büyütülmüştür. 2 aylık bir büyütme periyodu sonunda toprağa aktarılan bitkiciklerde kromozom sayımı yapılmış ve katlama işleminin genotipten çok etkilendiği görülmüştür.  $5 \times 10^{-5}$  dozunda kolşisin katılarak 1, 2, 3 ve 6 gün;  $1 \times 10^{-4}$  dozunda kolşisin katılarak 1, 3 ve 6 gün süreyle bu ortamda bekletilen meristemlerden oluşan bitkilerde kromozomların katlandığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada da kolşisin dozunun ve süresinin kromozom katlanmasında etkili olduğu bulunmuştur.

**Compton ve ark. (1996)**, *in vitro* diploid karpuz kotiledonlarından elde edilen tetraploid rejenerantların tanımlanmasında, ploidi seviyesinin tespit edilmesiyle birlikte yaprak ve çiçeklerde ölçümler yapılmıştır. Çalışmada, ploidi seviyesinin tespit edilmesinde bekçi hücrelerdeki kloroplastların sayılmasıyla da mümkün olduğunu ve tetraploid rejenerantlarda kloroplast sayısı ortalaması; 19.1 iken, diploidlerde ise 11.2 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca tetraploid oluşumun belirlenmesinde, ovaryum çapı ve boyu, petal ve anter çapının, yaprak uzunluğu ve genişliğinin iyi bir işaret ve kriter olacağını bildirmişlerdir. Tetraploid bitkilerde yaprak uzunluğu, diploid bitkilere göre daha kısa, yaprak genişliğinin ise tetraploidlerde diploidlere göre daha geniş olduğu belirtilmiştir. Diploid Jubile II çeşidinde, yaprak uzunluğu; 14.11 cm, yaprak genişliği ise 12.10 cm iken aynı çeşidin tetraploid bitkilerdeki yaprak uzunluğu; 12.48 cm, yaprak genişliği ise 12,64 cm olarak ölçülmüştür.

Tetraploid eldesi için yaptığımız çalışmada, tetraploid bitkilerde yaprak genişliği (16.55 cm) diploid bitki yapraklarına (13.71 cm) göre daha geniş olduğu, yaprak uzunluğunda ise tetraploid bitkilerde yaprak uzunluğu (15.46 cm), diploid bitki yapraklarından (18.41 cm) daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımız araştırmacının bulgularıyla paralellik göstermektedir.

#### 4.7. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Bu araştırmada, kullanılan bitkisel materyalin ploidi seviyesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ploidi seviyesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yöntem, materyal ve metot bölümünde anlatılmıştır. Sürme çeşidinin doğada yetişen ve hiçbir kimyasal uygulama olmaksızın bitkisel materyalinin ploidi seviyesi ile kolşisin uygulanan tohum ve bitkilerde ploidi seviyesi ve *in vitro* ortamın etkisinden dolayı rejenerantlarda ploidi seviyesinde değişiklik olup olmadığı diğer gruplarla karşılaştırılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Tüm grupların ploidi seviyelerine ait kloroplast sayıları istatistik analize tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 34'de verilmiştir.

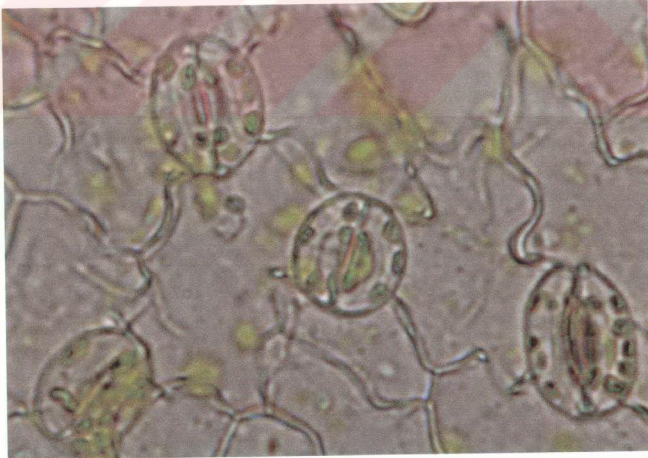
Çizelge 34. Sürme çeşidine ait kloroplast sayıları\*.

Kültür çeşidi	Çoğaltım metodu	Kloroplast sayısı
Sürme Çeşidi	Tohumdan çimlendirilen	10.70 ± 0.34 c
	<i>In vitro</i> rejenerant	8.18 ± 0.35 d
	Tarlada kolşisin uygulaması	19.47 ± 0.53 a
	Tohuma kolşisin uygulaması	16.95 ± 0.75 b

\*Kullanılan eksplant sayısı:20



Test edilen gruplar arasında istatistiksel farklılık önemli çıkmıştır. Bu araştırmada, *in vitro* ortamda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin ploidi düzeyinde bir değişikliğin olup olmadığını tespit etmek için *in vitro* rejenerantlar kullanılmıştır (**Resim 15**). *In vitro*'da meydana gelebilecek ploidi değişikliği, rejenerantların araziye aktarılmasından sonra sorun oluşturacaktır. Uygulama grupları arasında en düşük kloroplast sayısı *in vitro*' dan çoğaltılan rejenerantlarda;  $8.18 \pm 0.35$  olarak sayılmıştır. Bu durum, çoğaltılan rejenerantların, diploid ploidi seviyesine sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu değer, *in vitro*'da proliferasyon çalışmalarında kullandığımız hormonların (prolifereasyonda BA ve köklenme ortamında NAA), rejenerantların ploidi seviyesinde bir değişikliğe neden olmadıkları tespit edilmiştir. Tohumdan çimlendirilen materyale ait kloroplast sayısı,  $10.70 \pm 0.34$  olarak bulunmuştur (**Resim 16**). Tüm gruplar arasında en düşük kloroplast sayısı *in vitro* rejenerantlarda bulunmuş ve bunu tohumdan yetiştirilen materyal izlemiştir. Tohumdan yetiştirilen materyalin de kloroplast sayısına göre diploid olduğu tespit edilmiştir. Test edilen gruplar arasında, en yüksek kloroplast sayımı,  $19.47 \pm 0.53$  olarak tarlada kolşisin uygulanan bitkilerde sayılmıştır (**Resim 17**). Tohuma kolşisin uygulanan bitkilerde kloroplast sayısı,  $16.95 \pm 0.75$  olup, tarlada kolşisin uygulanan bitkilere ait kloroplast sayısından daha düşük olduğu görülmüştür (**Resim 18**).



**Resim 15.** *In Vitro* Rejenerantların Yapraklarında Kloroplastlar



*Resim 16. Tohumdan Çimlendirilen Fide Yapraklarında Kloroplastlar*



*Resim 17. Kolşisin Uygulanmış Bitkinin, Yapraklarında Kloroplastlar*



*Resim 18. Tohumuna Kolşisin Uygulanmış Fide Yapraklarında Kloroplastlar*

Tarlada kolşisin uygulamasının, kromozom sayısını iki kat artırmada daha etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte doğrudan tohuma veya tarlada büyüme uçlarına kolşisin uygulamasının kromozom sayısını iki katına çıkarmada etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak tohuma kolşisin uygulamasının daha pratik olduğu, daha düşük konsantrasyon kullanılması gibi avantajlarından dolayı tetraploid veya poliploid eldesi için kullanılabilceği düşünülse de bu grupta sayılan kloroplast sayısı tarlada kolşisin uygulanan bitkilerde sayılan kloroplast sayısından daha düşük çıktığından tarlada kolşisin uygulamasının daha etkin olduğu görülmüştür. Ploidinin artırılmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda; zaman, ortam ve olanaklar ölçüsünde materyalin kendisi de önemlidir. Bundan dolayı bazen arazi şartlarında uygulama zorunluluğu olabilecek durumlarda tarlada kolşisin uygulaması kaçınılmaz olabilir.

#### 4.7.1. Ploidi Seviyesi İle İlgili Değerlendirme

**Compton ve ark. (1994)**, diploid karpuz kotiledonlarından tetraploid bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada, tetraploid ve diploid tanımlanmasını, rejenerantların yapraklarında kloroplastların sayılmasıyla yapmışlardır. Yapılan çalışmada, diploid rejenerantlardaki kloroplast sayısının ortalaması; 11.2 tetraploidlerde ise 18.6 olarak bulunmuştur. Tetraploidlerde kloroplast sayısı, diploidlerden 1.7 kat daha fazla olduğunu ve bitkilerde ploidi seviyesinin yapraklardaki kloroplastların sayılmasıyla tespit edilebileceğini



bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada diploid rejenerantlarda kloroplast sayısı 8.18, tohumdan çimlendirilen bitki yapraklarında ise 10.70 olarak sayılmıştır. Elde edilen bu değerler doğrultusunda kullanılan materyalin diploid olduğu ve araştırmacının bulgularıyla paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Tetraploid oluşumu belirlemek için yaptığımız kloroplast sayımında kolşisin uygulanan bitkilerin, yapraklarında kloroplast sayısı; 19.47 ve tohuma kolşisin uygulanmış bitki yapraklarında ise 16.95 olarak sayılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler doğrultusunda tetraploidlerin kloroplast sayısı, diploidlerden en az 1.58 ile en yüksek 2.38 kat daha fazla olduğu hesaplanmıştır.

Elde edilen bu değerler araştırmacının tetraploidler için verdiği değerler ile uyum içinde olup kromozom sayısının ikiye katlanarak tetraploid oluşumunun başarıldığını ve araştırmacının bulguları, bulgularımızı destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

**Sarı (1994)**, karpuzda ploidi seviyesinin belirlenmesinde, flow sitometri tekniğinin; basit ve hızlı yapılmasına rağmen alet ve kullanılan kimyasalların pahalı olması ve iyi bir kullanıcıya ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir. Araştırmacı, karpuzda ploidi seviyesinin belirlenmesinde flow sitometriye alternatif olarak değerlendirdiği, yaprak epidermis hücrelerindeki stoma boyutları ile kloroplast sayısını da kullanmıştır. Yaptığı çalışmada, kloroplast sayısı; haploidlerde 6-7, diploidlerde 11-12, triploid ve tetraploidlerde ise 18 adet olarak bulmuştur. Kloroplast sayısı ile ilgili olarak diploid ve tetraploidlerde elde ettiğimiz sonuçlar araştırmacının bulgularıyla özdeştir.

**Compton ve ark. (1999)**, diploid ve tetraploid bitkilerde ploidi seviyesinin tespitini, yapraklarda kloroplastların sayımını yaparak bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada, *in vitro* diploid sürgünlerde; 9.73, *in vitro* tetraploid sürgünlerde 17.16, *in vitro* diploid bitkilerde 9.37, *in vitro* tetraploid bitkilerde 17.11 olarak bulunurken diploid *in vivo* sera bitkilerinde 11.19 ve tetraploid *in vivo* sera bitkilerinde ise 18.71 kloroplast tespit edilmiştir. Çalışmamızda diploid *in vitro* rejenerantlarda 8,18 ve *in vivo* sera bitkilerinde ise 10.70 kloroplast sayısı ile tetraploid *in vivo* bitkilerinde 19.47 kloroplast sayısı araştırmacının bulgularıyla paralellik göstermiştir.

**Compton ve ark. (1996)**, *in vitro* diploid karpuz kotiledonlarından elde edilen tetraploid rejenerantların tanımlanmasında, ploidi seviyesinin tespit edilmesiyle birlikte yaprak ve çiçeklerde ölçümler yapılmıştır. Çalışmada, ploidi seviyesinin tespit edilmesinde kloroplastların sayılmasıyla da mümkün olduğunu ve tetraploid rejenerantlarda kloroplast sayısı ortalaması; 19.1 iken, diploidlerde ise 11.2 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca tetraploid

oluşumun belirlenmesinde, ovaryum çapı ve boyu, petal ve anter çapının, yaprak uzunluğu ve genişliğinin iyi bir işaret ve kriter olacağını bildirmişlerdir. Tetraploid bitkilerde yaprak uzunluğu, diploid bitkilere göre daha kısa, yaprak genişliğinin ise tetraploidlerde diploidlere göre daha geniş olduğu belirtilmiştir. Diploid JubileII çeşidinde, yaprak uzunluğu;14.11 cm, yaprak genişliği ise 12.10 cm iken aynı çeşidin tetraploid bitkilerdeki yaprak uzunluğu, 12.48 cm, yaprak genişliği ise 12.64 olarak ölçülmüştür. Çalışmamızda diploid ve tetraploidlerde kloroplast sayısı bakımından bulgularımız araştırmacının bulgularıyla uyum içinde olduğu görülmüştür. Bitkisel özellikler açısından ise tetraploid bitkilerde; diploidlere göre yapraklar daha kısa, yaprak genişliği ise daha fazla bulunmuş olup bulgularımız araştırmacının bulgularıyla uyum içindedir.





## 5. SONUÇ

Karpuz, Diyarbakır'ın kültürel, folklorik ve ekonomik yaşantısında oldukça önemli bir konuma sahiptir. Yörede her yıl yapılan karpuz festivalleri, güvercin gübresinin temini için inşa edilen borahaneler, bostanlarda kurulan hülleler, çayda çıra oyunları vb. etkinlikler karpuzun yöre halkının yaşantısında ayrılmaz bir tarımsal ürün olarak günümüze kadar önemini korumuştur. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin, *Cucurbitaceae* familyasının bir mikro gen merkezi olması, Diyarbakır ve yöresinde karpuzun yöreye özgü bir teknikle yoğun olarak yetiştirilmesi, büyüklük ve tat açısından dünyaca tanınması ve maalesef bazı çeşitlerinin kaybolması ve diğer çeşitlerinin de kaybolmaya itilmesi, Diyarbakır karpuzuyla ilgili *in vitro* çalışmaların yapılmasını zorunlu kılmıştır. GAP'ın faaliyete geçtiği şu günlerde, bölgeye hibrit karpuz çeşitlerinin girmesiyle mevcut yerel çeşitlerin bunlara karşı rekabet gücünün azalmasından dolayı yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmıştır. Diyarbakır karpuzunun ıslahına yönelik bir *in vitro* çalışma olmadığı gibi herhangi bir tarla çalışması da şu ana kadar rapor edilmemiştir. Çiçek biyolojisinden dolayı, yabancı tozlanma görülürken bu durum, klasik ıslah çalışmasını ve sürecini de güçleştirmektedir.

Tez çalışması kapsamında yapılan araştırma, 7 ana başlık altında yürütülmüş olup sonuçlar aşağıda sunulmuştur. Her bölümde elde edilen optimum değerler bir sonraki bölümde kullanıldığından, sonuçlar birbirleriyle yakından ilişkilidir. Tüm bölümlerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Diyarbakır karpuzu "Sürme" çeşidi için bir mikroçoğaltım yöntemi tanımlanmıştır.

### 1. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi

*In vitro* çalışmalarda başarıyı etkileyen ve araştırmanın temelini oluşturması bakımından sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gerekmektedir. Araştırmada kullanılması düşünülen her materyal için yüzey sterilizasyonu geliştirilmiştir. Bir yıllık tohumlar ve taze meyveden çıkarılan olgun tohumlar, %3 NaOCI'te 5 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonunun gerçekleştiği bulunmuştur. Araştırmada kullanılan ve araziden getirilen bitkisel materyalin, %4 NaOCI'te 40 dakika bekletilerek sterilizasyonunun mümkün olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* seradan getirilen bitkisel materyalin sterilizasyonunda ise %4 NaOCI kullanılarak eksplant 20 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır.

## 2. Kültür Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

Bu bölümde, Diyarbakır karpuzu “Sürme” çeşidi için geliştirilen *in vitro* optimum kültür koşulları tez kapsamında yapılan tüm çalışmalarda, temel kabul edilip kullanılmıştır. Besi ortamı olarak 1/1 kuvvetindeki MS besi ortamı, en uygun besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. Hidrokarbon kaynağı olarak kullanılan şeker tipi ve konsantrasyonunun, 30 g l<sup>-1</sup> sakkarozun *in vitro* çalışmalarımızda en iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Hazırlanan besi ortamının, pH'sı, 5.8'e ayarlanarak kullanılabilceği tespit edilmiş ve besi ortamının katılaştırılmasında optimum agar konsantrasyonunun 7 g l<sup>-1</sup> olduğu görülmüştür. Araştırmada, kotiledonun yüksek organojenezis potansiyeline sahip olduğundan eksplant olarak kullanılabilceği tespit edilmiş ve bu kotiledonların hipokotilden itibaren 0.5 cm büyüklüğünde kullanılması halinde daha yüksek performans gösterdiği tespit edilmiştir. Büyüme odasına aktarılan kültürlerin normal gelişme gösterebileceği en uygun ışık yoğunluğunun; 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> olduğu saptanmıştır.

## 3. Sürgün proliferasyon çalışmaları

Sürgün proliferasyonunu artırmak için etkili komponentlerin farklı uygulamaları denenmiştir. Sürgün proliferasyonunda, etkin hormon kullanımı başarı şansını artıracaktır. Çalışmada, BA kullanımının sürgün proliferasyonunu artırdığı ve en uygun BA konsantrasyonunun ise 0.5 mg l<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Eksplant yaşının sürgün proliferasyon çalışmasında etkili olduğu görülmüştür. Farklı eksplant yaşlarının iyimser sonuçlar vermesi sevindirici olurken 5 günlük kotiledonların en uygun eksplant yaşı olduğu görülmüştür. Mevsime bağlı kalmaksızın mikroçoğaltımın miktarını ve süresini yakından etkileyen altkültür sayısı; sürgün proliferasyonunda beklenenin aksine olumlu sonuçlar vermiştir. Ancak 1. altkültürün sürgün proliferasyonunda etkin olduğu görülmüştür. Altkültürün sürgün proliferasyonunda etkin bir faktör olması, kültürde bekleme süresinin sonuçlarıyla yakından ilişkili olduğu ve 3 haftalık sürenin en uygun kültürde bekleme süresi olduğu bulunmuştur. Tüm altkültürlerde sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri kullanılabilir niteliktedir.

## 4. Rejenerantları Köklendirme Çalışmaları

Sürgün proliferasyon çalışmalarından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için mikroçoğaltım çalışmalarında önemli bir aşamadır. Oksin grupları arasında rejenerantların

köklendirilmesinde en uygun oksin tipinin NAA olduğu bulunmuştur. Köklenmede  $1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA konsantrasyonunun en yüksek köklenme oranını verdiği fakat kültürlerin 7 gün süreyle karanlık bırakılması halinde ise aynı konsantrasyonda yüksek köklenme oranının daha yüksek çıktığı tespit edilmiştir. *In vitro* karpuz rejenerantların köklenmesinde karanlık ortamın etkisiyle ilgili bir araştırmaya rastlanılmadığından, elde ettiğimiz sonuç önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca karanlıkta bırakılmak suretiyle başta 1. altkültür olmak üzere tüm altkültürlerde elde edilen köklenme oranları tatminkar bulunmuştur.

## 5. Aklimatizasyon

*In vitro*da köklenen rejenerantların, doğal koşullara alıştırılması sıcaklık ve ışığın kontrol edildiği büyüme odasında yapılmıştır. Köklenmiş rejenerantların aklimatizasyonunda sterilize edilmiş substrat olarak torfun kullanılması hayatta kalan fide oranını artırdığı tespit edilmiştir. Aklimatizasyondan çıkarılan bitkiler başarılı bir şekilde araziye aktarılmıştır.

## 6. Tetraploid Oluşturulması

Diyarbakır karpuzunun ıslahı kapsamında yürütülen ve ileride üretilmesi düşünülen triploid karpuz çeşidi için tetraploid oluşum elde edilmiştir. Tetraploid eldesi için tohuma, %0.02'lik kolşisin konsantrasyonunun 24 saat uygulanmasının etkili olduğu tespit edilmiştir. Tarlada bitkiye kolşisin uygulamasında ise %0.2 kolşisin konsantrasyonunun etkili olduğu bulunmuştur. Bazı bitkisel özellikler, tetraploid oluşumun etkisiyle diploidlerden farklı olduğu morfolojik olarak da tespit edilmiştir.

## 7. Ploidi Seviyesinin Tespiti

Ploidi seviyesinin belirlenmesinde, yaprak epidermasında kloroplast sayılmasının etkin bir metot olduğu görülmüştür. Kullanılan bu yöntem sayesinde, Diyarbakır karpuzu "Sürme" çeşidinin diploid ve kloroplast sayısının 10.70 olduğu tespit edilmiştir. Kolşisin uygulaması sonucu tetraploid oluşuma sahip bitkilerde kloroplast sayısının 19.47 olduğu bulunmuştur.

Diyarbakır karpuzu "Sürme" çeşidi için geliştirilen *in vitro* mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak, bir eksplantla başlayan sürgün rejenerasyon çalışmasından 3 ay gibi kısa bir sürede ortalama olarak 384 adet fide üretilmesi mümkün olmuştur. Bu değer kültür koşullarının iyileştirilmesi halinde daha da artacaktır. Geliştirilen bu mikroçoğaltım sistemi

sayesinde, üretim maliyeti azaltılarak, uniform, homojen, yüksek kalite ve verim değerine sahip ürün elde edilerek yöre çiftçisine ve ekonomiye katkı sağlayarak faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca “Sürme” çeşidi için geliştirilen bu mikroçoğaltım sistemi, kaybolmakta olan diğer Diyarbakır karpuz çeşitleri, “Pembe”, “Beyaz Kış” ve “Kara Kış” için de modifiye edilerek kullanılabilir. Böylelikle, Diyarbakır karpuz çeşitleri başta “Sürme” olmak üzere, koruma altına alınmış olup, ıslah süreci de başlatılmıştır. Günümüzde, gen transformasyon çalışmalarının baş döndürücü bir hızla ilerlediği ve bitkisel materyallerin ıslahı ve kalitesinin yükseltilmesinde etkin olduğu bilinmektedir. Geliştirilen bu yöntem, Diyarbakır karpuzu “Sürme” çeşidinin *in vitro* organojenezis adaptasyonunun ve potansiyelinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu model sayesinde gelecekte Diyarbakır karpuzu üzerine yapılacak diğer doku kültürü çalışmaları için de bir model olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma, karpuzda diğer doku kültürü ve genetik transformasyonlar için de temel olacak niteliktedir.



## 6. KAYNAKLAR

- ABAK, K., 1993.** Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu, 15-17 Ekim 1986, İzmir. TUBİTAK TOAG Yay., 59-66, Ankara.
- ABAK, K., 1995.** GAP Alanlarında Çeşit Seçimi ve Tohumluk. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, 315, Şanlıurfa
- ADELBERG, J. and RHODES, BB., 1989.** Micropropagation from Zygotic Tissues Of Watermelon. In: Thomas CE (Ed) Proceedings Of Cucurbitaceae 89: Evaluation and Enhancement Of Cucurbit Germplasm (pp. 110-112). USDA/ARS.
- ADELBERG, JW., RHODES, BB., SKORUPSKA, HT., BRIDGES WC., 1994.** Eksplant Origin Affects the Frequency of Tetraploid Plants from Tissue-Cultures of Melon. Hortscience, 29 (6): 689-692. JUN.
- AKBAY, G., 1988.** Farklı EMS( Ethyl Methane Sulponate) Dozlarının Uygulandığı Tokak 157-37(*Hordeum vulgare* L.) İki Sıralı Arpa Çeşidi Tohumlarının Farklı Sürelerle Bekletilmesinin Mı Bitkilerinin Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 107. Bilimsel Araştırmalar ve İncelemeler 573:1.
- ALPER, Y., ADELBERG, JW., YOUNG, RE. and RHODES, BB., 1994a.** Unitized, Nonselective Cutting of *In Vitro* Watermelon. Trans. ASAE 37: 1331-1336.
- ALPER, Y., YOUNG, RE., ADELBERG, JW. and RHODES, BB., 1994b.** Mass Handling Of Watermelon Microcuttings. Trans. ASAE 37: 1337-1343.
- AMMIRATO, PV., 1987.** Organizational Events During Somatic Embryogenesis. In: Gren Ce, Somers Da, Hackett Wp and Biesboer Dd (Eds) Plant Tissue And Cell Culture (Pp.57-81). Alan R. Liss, Inc.



**ANDRUS, CF., SESHADRI, VS. and GRIMBALL, PC., 1971.** Production of Seedless Watermelons. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture Technical Bulletin no. 1425.

**ANGHEL, I. and ROSU, A., 1985.** In Vitro Morphogenesis In Diploid, Triploid and Tetraploid Genotypes of Watermelon – *Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf. Rev. Roun. Biol.– Biol. Veget. 30:43-55.

**ANONİM, 2004.** Tarım İl Müdürlüğü, Proje İstatistik Şubesi, Diyarbakır.

**ANONYMOUS, 2004.** Information System For Biotechnology Website, Retrieved January 2002 from <http://www.isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm>.

**ANONYMOUS, 2004.** FAO Statistical Database, <http://www.fao.org>.

**BABAOĞLU, S., YORGANCIOĞLU, M., AKBUDAK, M.A., 2002.** Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri: Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları (Edt. BABAOĞLU, S., GÜREL, E., ÖZCAN, S.) Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. Konya, 32.

**BARNES, LR., 1979,** In Vitro Propagation of Watermelon. Sci. Hord. 11: 223-227.

**BARNES, LR., COCHRAN, FD., MOTT, RL., and HENDERSON, WR., 1978.** Potential Uses Of Micropropagation for Cucurbits. Cucurbit Genet. Coop. Rep 1:21-22.

**BEŞİRLİ, G., 1991.** Diyarbakır Karpuzu Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Güneydoğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:2, Diyarbakır.

**BEYSANOĞLU, Ş., 1972.** Kara-Amid Tarih, Turizm, Edebiyat Dergisi sayı:8, Cilt II.

**BOYHAN, GJ, NORTON, D., JACOBSEN, BJ., and ABRAHAMS, BR., 1992.** Evaluation of Watermelon and Related Germplasm for Resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus. Plant Dis. 76: 251-252.

- BOYHAN, G.J., GUDAUSKAS, RT., NORTON, JD., and ABRAHAMS, BR., (1994)** Evaluation Of Watermelon And Related Germplasm for Resistance to the Egyptian Strain Of Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Plant Dis.* 78:100.
- BROWN, S.C., DEVAUX, P., MARIE, D., BERGOUNIOUX, C., PETIT, P.X., 1991.** Cytometrie En flux Application a l' Analyse de la Ploidie Chez Les Vegetaux. *Biofutur*, 105, 2-16.
- CAPPADOCIA, M., D.S.K. CHENG., and R. LUDLUM-SMONETTE., 1984.** Plant Regeneration From In Vitro Cultures Of Anthers Of *Solanum Chacoense* Bitt. And Interspecific Diploid Hybrids Of *S. tuberosum* L. X *S. chacoense* Bitt. *Theor. Appl.Genet.* 69:139-143.
- CHATURVEDI, R. and BHATNAGAR, SP., 2001.** High-Frequency Shoot Regeneration from Cotyledon Explants of Watermelon cv. Sugar Baby. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 37(2): 255-258 MAR-APRIL.
- CHOI, PS., SOH, WY., KIM, YS., YOO, OJ., and LIU, JR., 1994.** Genetic Transformation and Plant Regeneretaion of Watermelon Using *Agrobacterium Tumafaciens*. *Plant Cell Rep.* 13: 344-348.
- CHRISTANSON, M.I and WARNICK, D.A., 1983.** Competence and Determination in the Process of In Vitro Shoot Organogenesis. *Dev. Biol.*95:288-293.
- CLOUGH, GH., and HAMM, PB., 1995.** Coat Protein Transgenic Resistance To Watermelon Mosaic and Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash and Cantaloupe. *Plant Dis.* 79:1107-1109.
- COMPTON, ME., 1999.** Dark Pretreatment Improves Adventitious Shoot Organogenesis from Cotyledons of Diploid Watermelon. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58:185-188.

**COMPTON, ME., 2000.** Interaction between Explant Size and Cultivar Impacts Shoot Organogenic Competence of Watermelon Cotyledons. HortScience 35:749-750.

**COMPTON, ME. and GRAY, DJ., 1992.** Micropropagation as a Means of Rapidly Propagation Triploid and Tetraploid Watermelon Proc. Fla. State Hort. Soc. 105: 352-354.

**COMPTON, ME. and GARY, DJ., 1993a.** Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid, Triploid and Tetraploid Watermelon. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118: 151-157.

**COMPTON, ME. and GRAY, DJ., 1993b.** Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon. Plant Cell Rep. 12:61-65.

**COMPTON, ME. and GRAY, DJ., 1994.** Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Tetraploid Watermelon. HortScience 29: 211-213.

**COMPTON, ME. and GRAY, DJ., 1999.** Shoot Organogenesis from Watermelon Cotyledon Explants. in: Trigiano RN and Gray DJ (eds) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise*. 2nd edn (pp. 149-158). CRC Pres. Boca Raton, FL.

**COMPTON, ME, GRAY, DJ. and ELMSTROM, GW., 1993a,** A Simple Protocol for Micropropagating Diploid and Tetraploid Watermelon Using Shoot-Tip Explant. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33: 211-217.

**COMPTON, ME., GRAY, DJ., HIEBERT, E. and LIN, CM., 1993b.** Expression of the  $\beta$ -Glucuronidase Gene in Watermelon Cotyledon Explants Following Particle Bombardment or Infection with *Agrobacterium Tumefaciens*. HortScience 28: 138.

**COMPTON, ME., GRAY, DJ. and ELMSTROM, GW., 1994a.** Regeneration of Tetraploid Plants from Cotyledons of Diploid Watermelon. Proc. Fla. State. Hort. Soc. 107: 107-109.

**COMPTON, ME., GRAY, DJ., HIEBERT, E. and LIN, CM., 1994b.** Microprojectile Bombardment Prior to Co-Cultivation with *Agrobacterium* Improves GUS Expression in Watermelon Cotyledons. *In vitro Cell. Dev. Diol.* 30A: 62.

**COMPTON, ME., GRAY, DJ., and ELMSTROM, GW., 1996.** Identification of Tetraploid Regenerants from Cotyledons Of Diploid Watermelon Cultured In Vitro. *Euphtica* 87: 165-172.

**COMPTON, ME., BARNETT, N. and GRAY, DJ., 1999.** Use of Fluorescein Diacetate (FDA) to Determine Ploidy of *In Vitro* Watermelon Shoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 199-203.

**COMPTON, ME., PIERSON, BL. and STAUB, JE., 2001.** Micropropagation for Recovery of *Cucumis Hystrix*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64: 63-67.

**CRALL, JM., ELMSTROM, GW. and MCCUISTION, JR. FT., 1994.** SSDL: A High Quality Icebox Watermelon Breeding Line Resistant to *Fusarium* Wilt and Anthracnose. *HortScience* 29: 707-708.

**DABAUZA, M., et al., 1997.** Plant Regeneration and *Agrobacterium*- MEDIATED Transformation of Cotyledon Explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Plant cell Rpts.*16 (12): 888-892. OCT.

**DECOTEAU, DD., 2000.** Vegetable Crops, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

**DEMİR, İ., 1974.** Bitki Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Bornova, İZMİR.

**DESTEFANO-BELTRAN, L., NAGPALA, PG., CETİNER, MS., DODDS, JH. and JAYNES, JM., 1990.** Enhancing Bacterial and Fungal Disease Resistance in Plants: Application to Potato. in: Vayda ME and Pard WD (eds) *The Molecular and Cellular Biology of the Potato* (pp. 205-221). CAB International, Wallingford.

**DONG, JZ., and JIA, SR., 1991.** High efficiency Plant regeneration from Cotyledons of Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Rep. 9: 559-562.

**DORE, C., 1976.** Doublement Du Stock Chromosomique D' Haploides D'aspergr (*Asparagus Officinalis* L.) Par Culture *In Vitro* Des Meristemes En Presence De Colchisine. Ann Amelior. Plantes, 26(4), 647-653.

**EKİNCİ, S., 1972.** Özel Sebzeçilik. Ahmet Sait Matbaası. İstanbul, 231 s.

**ELMSTROM, GW. and MAYNARD, DN., 1992.** Growing Seedless Watermelons. Cooperative Extension Service, University of Fla, Institute of Food and Agricultural Sciences Bulletin HS 687.

**EVANS DA, SHARP, WR. and FLICK, CE., 1981.** Plant Regeneration from Cell Culture. Hort. Rev. 214-314.

**FASSULIOTIS, G., and B.V., NELSON., 1992.** Regeneration of Tetraploid Muskmelons from Cotyledons and Their Morphological Differences from Two Diploid Muskmelon Genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 863-866.

**FEHER, T., 1993.** Watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mastum. and Nakai, In: Kalloo G and Bergh BO (eds) Improvement of Vegetable Crops (pp. 295-311), Pergamon Pres, Oxford.

**FUCHS, M., MCFERSON, JR., TRICOLI, DM., MCMASTER, JR., DENG, RZ., BOESHORE, ML., REYNOLDS, JF., RUSSELL, PF., QUEMADA, HD. and GONSALVES, D., 1997.** Cantaloupe Line CZW-30 Containing Coat Protein Genes of Cucumber Mosaic Virus, Zucchini Yellow Mosaic Virus, and Watermelon Mosaic Virus-2 Is Resistant to These Three Viruses in the Field. Mol. Breed. 3: 279-290.

**GARSTER, H., 1997.** The Potential Role of Lycopene for Human Health. J. Am. Coll. Nutr. 16: 109-126.



**GILLASPIE, JR. AG. and WRIGHT, JM., 1993.** Evaluation of *Citrullus* sp. Germplasm for Resistance to Watermelon Mosaic Virus 2, *Plant Dis.* 77: 352-354.

**GRAY, DJ., and ELMSTROM, GW., 1991.** Process for the Accelerated Production of Triploid Seeds for Seedless Watermelon Cultivars. United States Patent No. 5,007,198.

**HAMMERSCHLAG, FA., 1988.** Selection of Peach Cells for Insensitivity to Culture Filtrates of *Xanthomonas Camperstris* Pv. Pruni And Regeneration Of Resistant Plants. *TAG* 76: 865-869.

**GÜNAY, A., 1992.** Genel Sebzeçilik. Cilt 1. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 1-7.

**GÜREL, E., TÜRKER-UÇAR, A., 2002.** Organogenesis: Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları (BABAĞLU, S., GÜREL, E., ÖZCAN, S.) Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. Konya, 55-56.

**GÜRSÜZ, N., ABAK, K., PITRAT, M., RODE, J.C., DUMAS DE VAULX, R., 1991.** Obtention of Haploid Plants Induced by Irradiated Polen In Watermelon (*Citrullus lanatus*), *Cucurbit Genetics Cooperative*, 14, 109-110.

**HAMMERSCHLAG, FA., 1990.** Resistant Responses Of Plants Regenerated From Peach Callus to *Xanthomonas Campestris* Pv. Pruni *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:1034-1037.

**HARTMANN, HT., KESTER, DE., DAVIES FT, JR, and GENEVE, RL., 1975.** Plant Propagation; Principles and Practices, 6th edn. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ.

**HATİPOĞLU, R., 1999.** Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No:A-58, 1.

**HUANG, Y., NORDEEN, RO., DI, M., OWENS, LD. and MCBEATH, JH., 1997.** Expression of An Engineered Cecropin Gene Cassette in Transgenic Tobacco Plants Confers Resistance to *Pseudomonas Syringae* Pv. Tabaci. *Phytopathology* 87: 494-499.

**JARRET, R.L. and NEWMAN, M., 2000.** Phylogenetic Relationships among Species of *Citrullus* and the Placement of *C-rehmii* De Winter as Determined by International Transcribed Spacer (ITS) Sequence Heterogeneity. *Genetic Resources and crop evolution*, 47: 215-222.

**JAWORSKI, JM., and COMPTON, ME., 1997.** Plant Regeneration from Cotyledons of Five Watermelon Cultivars. *HortScience* 32:469.

**JAYASANKAR, S., and LITZ, RE., 1998.** Characterization Of Embryogenic Mango Cultures Selected For Resistance To *Colletotrichum Gloeosporioides* Culture Filtrate And Phytotoxin. *Theor. Appl. Genet.* 96: 823:823-831.

**JAYASANKAR, S., LI, Z. and GRAY, DJ., 2000.** In Vitro Selection of *Vitis Vinifera* “Chardonnay” with *Elsinoe Ampelina* Culture Filtrate is Accompanied by Fungal Resistance and Enhanced Secretion of Chitinase. *Planta* 211: 200-208.

**JAYNES, JM., XANTHOPOULOS, KG., DESTEFANO-BELTRAN, L. and DODDS, JH., 1987.** Increasing Bacterial Disease Resistance in Plants Utilizing Antibacterial Genes from Insects. *Bio-Essays* 6:263-270.

**KARCHI, Z., GOVERS, A., NERSON, H., 1981.** “Alena” Watermelon, *Hort.Science* 16 (4), 573.

**KARCHI, Z., NERSON, H., PARIS, H.S., EDELSTEIN, M., GOVERS, A., 1983.** The Importance of Cultural Practices in Materializing Yield Potential in a Tetraploid Watermelon Cultivar. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 6, 59-61.

**KIHARA, H., 1951.** Triploid Watermelon. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 58:217-230.

**KÜTEVİN, Z. ve TÜRKEŞ, T., 1985.** *Sebzecilik. Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzecilik Yöntemleri*, 241-243.

**LIU, Q., INGERSOLL, J., OWENS, L. and SALIH, S., 2001.** Response of Transgenic Rolay Gala Apple (*Malus X Domestica* Borkh) Shoots Carrying A Modified Caardopin MB39 Gene, To *Erwinia Amylovora*. *Plant Cell Rep.* 20: 306-312.

**LOWER, R. L. and JOHNSON, K.W., 1969.** Observation on Sterility of Induced Autotetraploid Watermelons. *J.Amer. Soc. Hort. Soc.,* 94(4), 367-369.

**LUCIER, G., and LIN, BH., 2001.** Factors Affecting Watermelon Consumption in The United States. In: Anonymous (Eds) *Vegetables And Specialties: Situation And Outlook*, VGS-287 (pp 23-29). USDAERS.

**MAESTRO-TEJADA, M.C., 1992.** Resistance Du Melon Aux Virus. Interaction Avec Les Pucerons Vecteurs. Analyse Genetique Sur Lignes Haplodiploides. These De Docteur, Specialite "Biologie Des Organismes Et Populations". Univ. De Droit. d' Economie et des Sciences d' Aix-Marseille, 134 p.

**MANSUROĞLU, S. ve GÜREL, E., 2002.** Mikroçoğaltım: Bitki Biyoteknoojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları (Edt., BABAĞLU, S., GÜREL, E., ÖZCAN, S.) Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 262-281.

**MANTELL, SH., MATTHEWS, J.A., MCKEE, R.A., 1985.** Principles of Plant Biotechnology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**MARR, CW., and GAST, KLB., 1991.** Reactions by Consumers in A "Farmers" Market to Prices For Seedless Watermelon And Ratings Of Eating Quality. *HortTechnology* 1: 105-106.

**MCCUISTION, G., and ELMSTROM., GW 1993.** Identifying Polyploids of Various Cucurbits. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 106: 155-157.

**MOHAMMED, MF., READ, PE. and COYNE, DP., 1992.** Dark Preconditioning.CPPU, and Thidiazuron Promote Shoot Organogenesis on Seedling Node Explants of Common and Faba Beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:668-667.

**MOHR, HC., 1986.** Watermelon Breeding. In: Breeding Vegetable Crops (Bassett MJ (ed)). Part 2 (pp. 37-66). AVI Publishing Co., Inc, Westport, CT.

**MOORE, J., 2001.** Blot out blotch. Am. Veg. Grower 49: 22-24.

**MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962.** A Revised Medium For Rapid Growth And Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

**NAMBA, S., LING, K., GONSALVES, C., SLIGHTOM, JL. and GONSALVES, D., 1992.** Protection Of Transgenic Plants Expressing the Coat Protein Gene of Watermelon Mosaic Virus II or Zucchini Yellow Mosaic Virus Against Six Potyviruses. *Phytopathology* 82:940-946.

**NIEDZ, R.P., SMITH, S.S., DUNBAR, K.B., STEPHENS, C.T. and MURAKSISHI, H.H., 1989.** Factor Influencing Shoot Regeneration from Cotyledonary Explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*18:313-319.

**PİRİNÇ, V., ONAY, A., YILDIRIM, H., ADIYAMAN, F., IŞIKALAN, 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), 101-107.

**PROVVIDENTI, R., 1991.** Inheritance of Resistance to the Floride Strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus In Watermelon. *HortScience* 26: 407-408.

**PUNJA, ZK., ABBAS, N., SAMENTO, GG., and TANG, FA., 1990.** Regeneration of *Cucumis sativus* var. *Sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from Explants Through Somatic Embryogenesis. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 21: 93-102.

**RANE, KK., and LATIN, RX., 1992.** Bacterial Fruit Blotch of Watermelon: Association of the Pathogen With Seed. *Plant. Dis* 76:509-512.

**REED, J., PRIVALLE, L., POWELL, ML., MEGHJI, M., DAWSON, J., DUNDER, E., SUTTIE, J., WENCK, A., LAUNIS, K., KRAMER, C., CHANG, Y.F, HANSEN, G., WRIGHD, M., ANDCHANG, YF., 2001.** Phosphomannose Isomerase: an Efficient Selectable Marker for Plant Transformation. *In Vitro Cell, and Dev. Diol. Plant* 37: 127-132.

**SARI, N., ABAK, K., PITRAT, M., RODE, J.C., DUMAS DE VAULX, R., 1994a.** Induction Of Parthenogenetic Haploid Embryos After Pollination by Irradiated Pollen in Watermelon, *HortScience*, 29 (10), 1189-1190.

**SAUER, J.D., 1993.** Historical Geography of Crop Plants—a selected roster. CRC Pres, Boca Ralon Florida.

**SCHIFINO, M.T., MORAES, FERNANDES, M. I. B., 1987.** Induction of Polyploid and Cytological Characterizastion of Autotetraploids of *Trifolium riagnandense* Burkat (Leguminosae). *Euphytica*, 36, 863-872.

**SCORZA, R., and HAMMERSCHLAG, FA., 1992.** Stone fruits. In: Hammerschlag FA and Litz RE (eds) *Biotechnology of Perennial Fruit Crops* (pp. 277-301. CAB International, Wallingford.

**SEÇMEN, Ö., GEMİCİ, Y., GÖRK, G., BEKÂT, L., LEBLEBİCİ, E., 2000.** Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116, 211-212.

**SINGSIT, C., and VEILLEUX., 1991.** Chloroplast Density in Guard Cells of Leaves of Anther-Derived Potato Plants Grown *In Vitro* An *In Vivo*. *HortScience* 26: 592-594.

**SINGSIT, C. and OZIAS-AKINS, P., 1992.** Rapid Estimation of Ploidy Levels in *In Vitro*-Regenerated Interspecific Arachis Hybrid And Fertile Triploid. *Euphytica* 64: 183-188.



**SRIVASTAVA, DR., ANDIANOV, VM. and PIRUZIAN, ES., 1989.** Tissue Culture and Plant Regeneration of Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. Cv. Melitopolski). Plant Cell Rep. 8: 300-302.

**SHAH, EA., 1984.** Isolation and Culture of Protoplastic: Tomato, In: Vasil IK (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1 (pp 370-380). Academic Press, Orlando.

**SUGIYAMA, K. and M. MORISHITA., 2000.** Fruit and Seed Characteristics of Diploid Seedless Watermelon (*Citrullus lanatus*) Cultivars Produced by Soft -X- irradiated Polen. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. Vol. 69. No. 6. p. 684-689. November.

**ŞENİZ, V., ÖZGÜR, M., SİVRİTEPE, Ö., ÖZER, M.H., 1995.** Sebzeçilik. Açıköğretim Fakültesi Yayınları No:458,1-21.

**SWAIDER, JM. and WARE, GW., 2002.** Producing Vegetable Crops, 5th edn. Interstate Publisher. Inc. Danville III.

**TRICOLI, DM., CARNEY, KJ., RUSSEL, PF., QUEMADA, HD., MCMASTER, RJ., REYNOLDS, JF. and DENG, RZ., 2002.** Transgenic Plants Expressing DNA Constructs Containing a Plurality of Genes to Impart Virus Resistance. United States Patent No. 6, 337, 431.

**TEKİN, A., 1987.** Mücadele Gazetesi Kültür ve Yaşam Sütunu (28 Nisan, 1987), Diyarbakır.

**VAN WYK, B. and GERICKE, N., 2000.** People's Plants- a Guide to Useful Plants of Southern Africa. Briza Publications, Preloria.

**VEILLEUX, RE. and JOHNSON, AAT., 1998.** Somaclonal Variation: Molecular Analysis, Transformation Interaction, and Utilization. In: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews, Vol. 16 (pp. 229-268). John Wiley and Sons, Inc., New York.

**WATTS, VM., 1962.** A Marked Male-Sterile Mutant in Watermelon J. Amer. Soc. Hort. Sci. 81:498-505.

**WATTS, VM., 1967.** Development of Disease Resistance and Seed Production in Watermelon Stocks Carrying the Ms. Gene. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 91: 579-580.

**XIA, X., LIU, Y., LIU, W. and CHEN, A., 1988.** Selection of Watermelon (*Citrullus vulgaris*) Male-sterile line G17AB. J. Shenyang Agric. Univ. 19: 9-13.

**YALTIRIK, F. ve EFE, A., 1989.** Otsu Bitkiler Sistematığı. Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayın No: 3568, 427.

**YETİŞİR, H., 2001.** Karpuzda Aşılı Fide Kullanımının Bitki Büyümesi, Verim ve Meyve Kalitesi Üzerine Etkileri ile Aşı Yerinin Histolojik Açından İncelenmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

**ZHANG, XP. and WANG, M., 1990.** A Genetic Male-sterile (ms) Watermelon from China. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 13:45.

**ZHANG, XP. and RHODES, BB., 1992.** Watermelon Variety Improvement in China. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 15: 76-79.

**ZHANG, XP., RHODES, BB. and ADELBERG, JW., 1994a.** Shoot Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 17: 111-115.

**ZHANG, XP., RHODES, BB. and WHITESIDES, JF., 1994b.** Determination of Watermelon Ploidy Level Using Flow Cytometry. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 17: 102-105.

**ZHANG, XP., SKORUPSKA, HT. and RHODES, BB., 1994c.** Cytological Expression in the Male-sterile ms Mutant In Watermelon. J. Hered. 85: 279-285.

## 7. ÇİZELGE LİSTESİ

## Sayfa

Çizelge 1.	Dünya karpuz üretiminin yıllara ve ülkelere göre dağılımı	10
Çizelge 2.	Murashige ve Skoog besi ortam içeriği	43
Çizelge 3.	Kabukları çatlatılmamış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi	62
Çizelge 4.	Kabukları çatlatılmış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi	63
Çizelge 5.	Kabukları çatlatılmış 1 yıllık tohumların yüzey sterilizasyonuna, %3'lük NaOCl'te farklı bekletme sürelerinin etkisi	64
Çizelge 6.	Taze tohumların sterilizasyonuna farklı uygulamaların etkisi	66
Çizelge 7.	Fidelerden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi	67
Çizelge 8.	Fidelerden alınan eksplantların sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te farklı bekletme sürelerinin etkisi	68
Çizelge 9.	Açıkta yetiştirilen fidelerden alınan eksplantların sterilizasyonuna %4'lük NaOCl'te farklı bekletme sürelerinin etkisi	70
Çizelge 10.	Sürgün proliferasyonuna MS, WPM, SH besi ortamlarının etkisi	72
Çizelge 11.	Sürgün proliferasyonuna MS besi ortamının farklı kuvvetlerinin etkisi	73
Çizelge 12.	Sürgün proliferasyonuna pH'nın etkisi	74
Çizelge 13.	Sürgün proliferasyonuna agar konsantrasyonunun etkisi	75
Çizelge 14.	Sürgün proliferasyonuna şeker tipinin etkisi	76
Çizelge 15.	Sürgün proliferasyonuna sakkarozun farklı konsantrasyonlarının etkisi	77
Çizelge 16.	Eksplant tipinin sürgün proliferasyonuna etkisi	78
Çizelge 17.	Eksplant büyüklüğünün sürgün proliferasyonuna etkisi	79
Çizelge 18.	Işık yoğunluğunun sürgün proliferasyonuna etkisi	80
Çizelge 19.	BA'in farklı konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonuna etkisi	83
Çizelge 20.	Kinetinin farklı konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonuna etkisi	85

<b>Çizelge 21.</b> Uygun BA konsantrasyonuna oksin ilavesinin sürgün proliferasyonuna etkisi	86
<b>Çizelge 22.</b> Eksplant (kotiledon) yaşının sürgün proliferasyonuna etkisi	87
<b>Çizelge 23.</b> Altkültür sayısının sürgün proliferasyonuna etkisi	88
<b>Çizelge 24.</b> Sürgün proliferasyonuna kültürde bekletme süresinin etkisi	89
<b>Çizelge 25.</b> IAA'ın köklenmeye etkisi	96
<b>Çizelge 26.</b> IBA'ın köklenmeye etkisi	97
<b>Çizelge 27.</b> NAA'nın köklenmeye etkisi	98
<b>Çizelge 28.</b> Altkültür sayısının köklenmeye etkisi	100
<b>Çizelge 29.</b> Eksplant tipinin (Nodal ya da apikal segment) köklenmeye etkisi	101
<b>Çizelge 30.</b> Karanlık işleminin köklenmeye etkisi	102
<b>Çizelge 31.</b> Substrat sterilizasyonunun aklimatizasyona etkisi	109
<b>Çizelge 32.</b> Diploid ve tetraploid bitkilerde ölçümler	110
<b>Çizelge 33.</b> Tohuma, farklı sürelerde kolşisin uygulaması.	111
<b>Çizelge 34.</b> Sürme çeşidine ait kloroplast sayıları.	114

## 8. RESİM LİSTESİ

## Sayfa

<b>Resim 1.</b>	Güvercin Yetiştirilen Borahane	13
<b>Resim 2.</b>	Diyarbakır'da Kuyu Karpuzu Yetiştiriciliği	14
<b>Resim 3.</b>	Diyarbakır Karpuzu Sürme Çeşidine Ait Meyveler	15
<b>Resim 4.</b>	Çalışmada Kullanılan Sürme Çeşidine Ait Tohumların Genel Görünümü	39
<b>Resim 5.</b>	Hormonsuz MS Besi Ortamında Çimlendirilmiş Kotiledonlar	40
<b>Resim 6.</b>	Bahçeden Alınan Eksplanlarda Sürgün Proliferasyonu	78
<b>Resim 7.</b>	0.5 mg l <sup>-1</sup> BA İçeren Besi Ortamında Sürgün Proliferasyonu	84
<b>Resim 8.</b>	3 Haftalık Kültürde Sürgün Proliferasyonu	90
<b>Resim 9.</b>	5 Haftalık Kültürde Sürgün Proliferasyonu	90
<b>Resim 10.</b>	1 mg l <sup>-1</sup> NAA'de Elde-Edilen Köklü Fide	100
<b>Resim 11.</b>	Aklimatizasyondan Çıkarılmış Fide	107
<b>Resim 12.</b>	Aklimatizasyona Alınmış Fideler	107
<b>Resim 13.</b>	Doğal Şartlara Aktarılmış Fideler	108
<b>Resim 14.</b>	Araziye Aktarılmış <i>In Vitro</i> Fide	108
<b>Resim 15.</b>	<i>In Vitro</i> Rejenerantların Yapraklarında Kloroplastlar	115
<b>Resim 16.</b>	Tohumdan Çimlendirilen Fide Yapraklarında Kloroplastlar	116
<b>Resim 17.</b>	Kolşisin Uygulanmış Bitkinin Yapraklarında Kloroplastlar	116
<b>Resim 18.</b>	Tohumuna Kolşisin Uygulanmış Fide Yapraklarında Kloroplastlar	117



**9. ŞEKİL LİSTESİ****Sayfa****Şekil 1. Dicle Nehri Boyunca Diyarbakır Karpuzunun Yetiştirildiği Köyler****12**

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde doğdum. İlkokulu, Diyarbakır'da İnönü ilkokulunda, orta ve lise öğrenimimi ise Diyarbakır Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1991 yılında Şanlıurfa'da bulunan Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne kayıt yaptırıldı. Harran Üniversitesi'nin kurulmasıyla, 1995 yılında aynı Fakülteden fakat Harran Üniversitesi Diploması olarak mezun oldum. 1996 yılında Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Aynı yıl Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım. “Şanlıurfa Yerel Patlıcan Populasyonlarının Kendilenmiş Hatlarıyla Karşılaştırılması Üzerinde Bir Araştırma” konulu, Yüksek Lisans Tezimi, 1999 yılında tamamladım. Doktora öğrenimime 2000 yılında, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladım.

