

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Hüsamettin Aycan ALP

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI SIKLAMEN TÜRLERİNİN
YUMRULARINDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE
SENTETİK TOHUM ÜRETİMİ ARAŞTIRMALARI**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI SIKLAMEN TÜRLERİNİN
YUMRULARINDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK
TOHUM ÜRETİMİ ARAŞTIRMALARI**

Hüsamettin Aycan ALP

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 13/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Selim ÇETİNER
ÜYE

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

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

.....
Doç. Dr. İlknur SOLMAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

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

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2016-5568

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

ÖZ
DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI SIKLAMEN TÜRLERİNİN
YUMRULARINDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK
TOHUM ÜRETİMİ ARAŞTIRMALARI**

Hüsamettin Aycan ALP

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

Danışman : Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl: 2020 Sayfa: 193
Jüri : Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Doç. Dr. İlknur SOLMAZ

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal yayılış gösteren *C. persicum*, *C. graecum*, *C. cilicium*, *C. coum* ve *C. pseudibericum* türlerinin yumrularından somatik embriyo elde edilmesi ve sentetik tohum üretim olanakları araştırılmıştır. Somatik embriyo yapılarını elde etmek için BBD olarak 2,4-D ve 2iP kullanılmıştır. *C. persicum* türünde 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP ve 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ 2iP içeren, *C. coum* türünde ise 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP ve 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.3 mg L⁻¹ 2iP içeren ½ MS ortamlarında somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. *C. cilicium* türünde ise yalnızca 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren besi ortamında somatik embriyo yapıları sağlanmıştır. *C. graecum* türünde organojenik yapılar elde edilirken, *C. pseudibericum* türünde yalnızca düşük oranda kallus gelişimleri gözlenmiştir. Sentetik tohum denemelerinde, rejenerasyon denemelerinde elde edilen somatik embriyolar ve *C. graecum* türüne ait sürgün yapıları kullanılarak enkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kaplama materyali olarak kullanılan sodyum aljinatın içerisine ilave edilen MS besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyiciler, *C. persicum* ve *C. coum* türlerinde çimlenme üzerine olumlu etki gösterirken, *C. cilicium* türüne ait somatik embriyolarda çimlenme gözlenmemiştir. Enkapsülasyon işleminin *C. graecum* türüne ait sürgün yapılarının rejenerasyonu üzerine ise olumsuz etki gösterdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cyclamen*, *in vitro*, enkapsülasyon, sodyum aljinat

ABSTRACT

PhD THESIS

RESEARCHES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED PRODUCTION OF TUBERS OF SOME CYCLAMEN SPECIES GROWN IN TURKEY

Hüsamettin Aycan ALP

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ
Year: 2020 Pages: 193
Jury : Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Assoc. Prof. İlknur SOLMAZ

In this study, the production possibilities of somatic embryo and synthetic seeds from tuber tissues of *C. persicum*, *C. coum*, *C. cilicium*, *C. graecum* and *C. pseudibericum* which naturally grown in Turkey were investigated. 2,4-D and 2iP were used as PGR to obtain somatic embryo structures. The embryogenic structures were obtained in the media supplied by 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP and 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ 2iP from *C. persicum*, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP and 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.3 mg L⁻¹ 2iP *C. coum*. For *C. cilicium* tubers, somatic embryos obtained only in the media supplied by 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP. While only organogenic structures were obtained from *C. graecum* tubers. Callus development was observed only from *C. pseudibericum* tubers. In synthetic seed experiments, encapsulation was performed by using somatic embryos of *C. persicum*, *C. coum* and *C. cilicium* and shoots of *C. graecum*. MS medium and plant growth regulators added into sodium alginate used as coating material had positive effect on germination for *C. persicum* and *C. coum* species, while germination was not observed from somatic embryos of *C. cilicium*. It was observed that the encapsulation process had a negative effect on the regeneration of shoot structures of *C. graecum*.

Keywords: *Cyclamen*, *in vitro*, encapsulation, sodium alginate

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Türkiye, topraklarında doğal yayılış gösteren bitki çeşitliliği bakımından oldukça zengin bir flora sahiptir. Türkiye'nin coğrafi konumu nedeni ile Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası bölgelerinin kesişme noktasında bulunması, zengin bitki çeşitliliği üzerinde önemli rol oynamaktadır ve endemik türler açısından da oldukça zengindir. Ülkemiz florasında yer alan bitkilerin yaklaşık 1/3'ü yalnızca ülkemizde doğal yayılış göstermekte olup, endemizm oranı %34'tür. Türkiye bitki çeşitliliğinin önemli bir bölümünü, geofit adı verilen soğanlı-yumrulu bitkiler oluşturmaktadır. Ülkemizin sahip olduğu geofit zenginliğinden biri de *Myrsinaceae* familyasına dâhil olan *Cyclamen* cinsidir. Dünyada 20'den fazla türü olan *Cyclamen* cinsi ülkemizde 10 takson ile yayılış göstermekte olup, bunlardan 6 tanesi ülkemize endemiktir. Türkiye'de yayılış gösteren ve ilkbaharda çiçek açan siklamen türleri; *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. intaminatum*, *C. trochopteranthum*, sonbaharda çiçek açan türler ise *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile*, *C. graecum*'dur. Endemik türler ise *C. cilicium*, *C. pseudibericum*, *C. intaminatum*, *C. trochopteranthum*, *C. mirabile* ve *C. parviflorum* olarak bilinmektedir.

Siklamen türleri ticari olarak tohumla üretilmektedir. Bunun için kullanılan hatlar saf hale gelene kadar kendilenmektedir. Ancak kendileme depresyonu ve abortif embriyo oluşumu gibi nedenler siklamen ıslahında *in vitro* yöntemlerin kullanımını zorunlu kılmaktadır. Somatik embriyogenesis kısa sürede çok sayıda bitki üretimini mümkün kıldığı için tercih edilmekte olan bir *in vitro* üretim yöntemidir. Benzer şekilde elde edilen propagüllerin kaplanarak sentetik tohumların üretilmesi, vejetatif üretim (üniformite) ile tohumla üretimin (taşımaya, depolama, mibzer kullanımı) avantajlarını birleştirdiği için oldukça avantajlı bir tekniktir.

Bu çalışmada, Türkiye'de doğal yayılış gösteren siklamen türlerinin (*C. coum*, *C. cilicium*, *C. graecum*, *C. persicum*, *C. pseudibericum*) yumrularından

somatik embriyo yapılarının elde edilmesi, bu yapılardan sentetik tohum üretilmesi hedeflenmiş ve ıslah çalışmaları ve gen kaynaklarının *in vitro* muhafazası konularına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışma süresince kullanılan türlerden ikisinin endemik (*C. pseudibericum* ve *C. cilicium*) diğer üç türün ise ülkemizde doğal yayılış gösteriyor olması özellikle genetik kaynakların muhafazası bakımından çalışmaya ayrı bir önem kazandırmaktadır.

Bunun için yumrular dinlenme ve çiçeklenme dönemleri olmak üzere iki farklı dönemde *in vitro* koşullarda kültüre alınmıştır. Somatik embriyo yapılarını elde etmek için BBD olarak 2,4-D ve 2iP kullanılmıştır. *C. persicum* türünde 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP ve 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ 2iP içeren, *C. coum* türünde 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP ve 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.3 mg L⁻¹ 2iP içeren ½ MS ortamlarında somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. *C. cilicium* türünde ise yalnızca 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren besi ortamında somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. *C. graecum* türünde organojenik yapılar elde edilirken, *C. pseudibericum* türünde yalnızca düşük oranda kallus gelişimleri gözlenmiştir. Sentetik tohum denemelerinde rejenerasyon denemelerinden somatik embriyo elde edilemediği için *C. graecum* türüne ait sürgün yapıları kullanılarak enkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kaplama materyali olarak kullanılan sodyum aljinatın içerisine ilave edilen MS besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyiciler, *C. persicum* ve *C. coum* türlerinde çimlenme üzerine olumlu etki gösterirken, *C. cilicium* türüne ait somatik embriyolarda çimlenme gözlenmemiştir. Enkapsülasyon işleminin *C. graecum* türüne ait sürgün yapılarının rejenerasyonu üzerine ise olumsuz etki gösterdiği gözlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, doktora tezi sırasında yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Nebahat SARI, Sayın Prof. Dr. Şebnem Şeküre ELLİALTIOĞLU ve Doç. Dr. İlknur SOLMAZ'a çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora tezi jüri üyelerinden Sayın Prof. Dr. Selim ÇETİNER ve Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmalarına olumlu eleştirileriyle katkı sağlayan, bana Adana seyahatlerimde ev sahipliği yapıp, doktora süresince yoldaş olan, eşine az rastlanır arkadaşlarım Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK, Dr. Tolga İZGÜ, Dr. Başar SEVİNDİK ve Dr. Mehmet TÜTÜNCÜ'ye teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerine ve bu tezin yapılmasında maddi destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman varlığını ve desteğini hissettiren ağabeyim Ömer Aydın ALP'e, bu günlere ulaşmamda sonsuz emeği olan annem Makbule ALP ve babam Akın ALP'e teşekkür ederim.

Hayatımın son 10 yılında, elde ettiğim her başarıda katkısı olan hayat arkadaşım Aycan ALP'e, motivasyon kaynağım ve yaşamımı anlamlı kılan evlatlarım Nil ve Asrın'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
2.1. Siklamen Türlerine İlişkin <i>In vitro</i> Çalışmalar	19
2.1.1. Siklamen Türlerinde <i>In vitro</i> Sterilizasyon	20
2.1.2. Siklamen Türlerinde Organogenesis Çalışmaları.....	24
2.1.2.1. Siklamen Türlerinde Mikro Yumru Elde Edilen <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	33
2.1.3. Siklamen Türlerinde Embriyogenesis Çalışmaları.....	34
2.1.4. Sentetik Tohum Çalışmaları.....	42
3. MATERYAL VE METOT	47
3.1. Materyal	47
3.1.1. <i>Cyclamen persicum</i> Miller	49
3.1.2. <i>Cyclamen coum</i> Miller	50
3.1.3. <i>Cyclamen pseudibericum</i> Hildebrand	51
3.1.4. <i>Cyclamen cilicium</i> Boissier & Heldreich	52
3.1.5. <i>Cyclamen graecum</i> Link	53
3.2. Metot.....	54
3.2.1. Sterilizasyon Denemeleri	54

3.2.2. Yumru Eksplantlarının Sterilizasyonu	56
3.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması	58
3.2.4. Uygun Eksplant Boyutunun Belirlenmesi.....	60
3.2.5. Yumruların Farklı Dönemlerde Kültüre Alınması	61
3.2.5.1. <i>C. persicum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> Türleri İlk Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri	62
3.2.5.2. İlk Yıl Dinlenme Dönemi Denemeleri	63
3.2.5.3. <i>C. graecum</i> ve <i>C. cilicium</i> Türleri İlk Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri	64
3.2.5.4. <i>C. coum</i> , <i>C. persicum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> Türleri İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri	65
3.2.5.5. İkinci Yıl Dinlenme Dönemi Denemeleri	65
3.2.5.6. <i>C. graecum</i> ve <i>C. cilicium</i> Türleri İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri	65
3.2.6. Köklendirme Denemeleri.....	66
3.2.7. Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu	66
3.2.8. Sentetik Tohum Denemeleri	67
4. BULGULAR.....	71
4.1. Sterilizasyon Denemelerine Ait Bulgular	71
4.2. Uygun Eksplant Büyüklüğünün Belirlenmesine Ait Bulgular.....	75
4.3. Farklı Dönemlerde Kültüre Alınan Türlere Ait Rejenerasyon Bulguları....	76
4.3.1. <i>C. persicum</i> Türüne Ait Bulgular.....	77
4.3.1.1. <i>C. persicum</i> Türüne Ait Birinci Çiçeklenme Dönemi Bulguları.....	77
4.3.1.2. <i>C. persicum</i> Türüne Ait İlk Yıl Dinlenme Dönemi Bulguları.....	82
4.3.1.3. <i>C. persicum</i> Türüne Ait İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Bulguları.....	87

4.3.1.4. <i>C. persicum</i> Türüne Ait İkinci Yıl Dinlenme Dönemi	
Bulguları.....	90
4.3.1.5. <i>C. persicum</i> Türüne Ait Dönem Farklılıkları.....	94
4.3.2. <i>C. graecum</i> Türüne Ait Bulgular.....	98
4.3.2.1. <i>C. graecum</i> Türüne Ait Birinci Çiçeklenme Dönemi	
Bulguları.....	99
4.3.2.2. <i>C. graecum</i> Türüne Ait Birinci Dinlenme Dönemi	
Bulguları.....	105
4.3.2.3. <i>C. graecum</i> Türüne Ait İkinci Çiçeklenme Dönemi	
Bulguları.....	108
4.3.2.4. <i>C. graecum</i> Türüne Ait İkinci Dinlenme Dönemi	
Bulguları.....	110
4.3.2. 5. <i>C. graecum</i> Türüne Ait Dönem Farklılıkları.....	113
4.3.3. <i>C. coum</i> Türüne Ait Bulgular.....	117
4.3.4. <i>C. cilicium</i> Türüne Ait Bulgular.....	122
4.3.5. <i>C. pseudibericum</i> Türüne Ait Bulgular.....	125
4.4. Köklendirme Ve Aklimatizasyon Bulguları.....	138
4.5. Sentetik Tohum Denemelerine Ait Bulgular.....	144
4.5.1. <i>C. persicum</i> Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları.....	145
4.5.2. <i>C. graecum</i> Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları.....	146
4.5.3. <i>C. coum</i> Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları.....	148
4.5.4. <i>C. cilicium</i> Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları.....	150
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	155
KAYNAKLAR.....	159
ÖZGEÇMİŞ.....	169
EKLER.....	171
Ek 1. <i>C.persicum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri	
arasındaki farklılıklar.....	173

Ek.2. <i>C.persicum</i> türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki farklılıklar.....	175
Ek 3. <i>C. graecum</i> türüne ait birinci çiçeklenme dönemi yumru bölgeleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları	176
Ek 4. <i>C. graecum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	178
Ek 5. <i>C. graecum</i> türüne ait ilk yıl dinlenme dönemi yumru bölgeleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları	181
Ek 6. <i>C. graecum</i> türüne ait ilk yıl dinlenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	182
Ek 7. <i>C. graecum</i> türüne ait ikinci çiçeklenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	185
Ek 8. <i>C. graecum</i> türüne ait ikinci dinlenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	187
Ek.9. <i>C. graecum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları	190
Ek.10. <i>C. graecum</i> türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları	192

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Sterilizasyon denemesine ait değişkenler	55
Çizelge 3.2. İkinci sterilizasyon denemesine ait değişkenler	56
Çizelge 3.3. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemelerinde kullanılan MS ortamı ve içeriği.....	59
Çizelge 3.4. Somatik embriyo elde etmek için kullanılan BBD kombinasyonları	60
Çizelge 3.5. Türlerin çiçeklenme dönemlerine göre <i>in vitro</i> kültüre alınma zamanları	62
Çizelge 3.6. Kaplama materyalinde kullanılan bileşenler	69
Çizelge 4.1. Birinci sterilizasyon denemesine ait sonuçlar	71
Çizelge 4.2. İkinci sterilizasyon denemesine ait sonuçlar	72
Çizelge 4.3. <i>C. persicum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme dönemi rejenerasyon bulguları	79
Çizelge 4.4. <i>C. persicum</i> türünde ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen kallus oluşum oranları	83
Çizelge 4.5. <i>C. persicum</i> türüne ait ilk yıl dinlenme döneminden elde edilen sürgün oluşum oranları.....	84
Çizelge 4.6. <i>C. persicum</i> türüne ait ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen kök oluşum oranları.....	85
Çizelge 4.7. <i>C. persicum</i> türüne ait ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen bitkicik oranları	86
Çizelge 4.8. <i>C. persicum</i> türüne ait ikinci yıl çiçeklenme dönemine ait rejenerasyon oranları	88
Çizelge 4.9. <i>C. persicum</i> türüne ait ikinci yıl dinlenme dönemi rejenerasyon oranları	94

Çizelge 4.10. <i>C. persicum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	95
Çizelge 4.11. <i>C. persicum</i> türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	96
Çizelge 4.12. Genotip ve bölgeler arası farklılık için kullanılan deneme deseni.....	100
Çizelge 4.13. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait alt ve üst yumru bölgelerine ilişkin rejenerasyon oranları	100
Çizelge 4.14. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları	101
Çizelge 4.15. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları	104
Çizelge 4.16. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait alt ve üst yumru bölgelerine ilişkin rejenerasyon oranları	105
Çizelge 4.17. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları.....	106
Çizelge 4.18. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları	107
Çizelge 4.19. İkinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları.....	108
Çizelge 4.20. İkinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları	109
Çizelge 4.21. İkinci dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyona oranları	111

Çizelge 4.22. İkinci dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları.....	112
Çizelge 4.23. <i>C. graecum</i> türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	113
Çizelge 4.24. <i>C. graecum</i> türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları.....	114
Çizelge 4.25. <i>C. coum</i> türünde çalışma süresince elde edilmiş olan kallus oranları	119
Çizelge 4.26. <i>C. cilicium</i> türünde elde edilmiş olan kallus oranları	123
Çizelge 4.27. <i>C. pseudibericum</i> türünde elde edilmiş olan kallus oranları	126
Çizelge 4.28. Farklı türlerde somatik embriyo elde edilen BBD konsantrasyonları	134
Çizelge 4.29. Farklı IBA dozlarında elde edilen köklenme oranları	138
Çizelge 4.30. <i>C. persicum</i> türüne ait alıştırma sonrası yaşama oranları.....	139
Çizelge 4.31. <i>C. graecum</i> türüne ait alıştırma sonrası yaşama oranları.....	142
Çizelge 4.33. <i>C. persicum</i> türüne ait yüzde çimlenme değerleri	146
Çizelge 4.34. <i>C. graecum</i> türüne ait yüzde rejenerasyon oranları.....	147
Çizelge 4.35. <i>C. coum</i> türüne ait çimlenme oranları	148
Çizelge 4.36. <i>C. cilicium</i> türünde oluşmaya devam eden somatik embriyo oranlarının haftalara göre yüzde değişim değerleri	150



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Türkiye'nin fitocoğrafik bölgeleri (Mutun, 2016)	1
Şekil 1.2. Türkiye'de <i>Cyclamen</i> türlerinin yayılış alanları (Mendi ve Çürük 2016)	5
Şekil 1.3. Ç.Ü. Kampüsünde doğal yayılış gösteren <i>C. persicum</i> türü	6
Şekil 1.4. <i>Cyclamen</i> bitkisinin genel görünümü (<i>C. persicum</i> , Ç.Ü. Kampüsü).....	8
Şekil 3.1. Bitkisel Materyalin Toplanması. A) Çukurova Üniversitesi Kampüs alanında yayılım gösteren bitkilerin yumruları ile birlikte çıkartılması. B) Çiçekli bir <i>C. persicum</i> türünün genel görünümü. C) Bitkilerin Seraya getirilerek saksılara aktarılması.....	48
Şekil 3.2. <i>C. persicum</i> türünün toplandığı kampüs alanı	49
Şekil 3.3. Doğal yayılış alanında <i>C. persicum</i> türü (Ç.Ü. Kampüsü, Adana)	50
Şekil 3.4. Doğal yayılış gösteren <i>C. coum</i> türü (Mendi ve Çürük, 2016)	51
Şekil 3.5. Doğal yayılış gösteren <i>C. pseudibericum</i> türü	52
Şekil 3.6. Doğal yayılış gösteren <i>C. cilicium</i> türü (Mendi ve Çürük, 2016).....	53
Şekil 3.7. <i>C. graecum</i> türünün toplandığı yerler	54
Şekil 3.8. A) Çiçeklenme döneminde alınan yumru, B) Bulaşık süngeri ile toprak parçalarının uzaklaştırılması, C) Antibakteriyel sabun ile fırçalayarak temizleme, D) Temizlenmiş yumruların genel görünümü.	57
Şekil 3.9. Sterilizasyon işleminin uygulanması. A) Çeker ocakta cıva klorür uygulanması. B) Steril kabin içerisinde kuru yakma işlemi. C) Sodyum hipoklorit uygulaması. D) Dilimlenmeye hazır yumrular.....	58
Şekil 3.10. Farklı boyutlarda kesilmiş eksplantların genel görünümü A) 2 cm X 1 cm eninde, B) 1 cm X 1 cm eninde, C) 0.5 cm X 0.5 cm eninde, D) 1 mm, 2 mm ve 3 mm eninde kesilmiş eksplantlar.....	61

Şekil 3.11. Denemede kullanılan yumruların genel görünümü	63
Şekil 3.12. Yumruların <i>in vitro</i> kültür için hazırlanması A) Sterilizasyon işleminde zarar gören dış yüzeyin temizlenmesi B) Yumruların dilimlenerek eksplantların elde edilmesi.....	63
Şekil 3.13. <i>C.cilicium</i> türüne ait 2 no’lu genotip A) Kabuk soyma işleminde kesilerek atılan üst bölgeye ait kısım, B) yumrunun “üst bölge” olarak kültüre alınan kısmı, C) yumrunun “alt bölge” olarak kültüre alınan kısmı, D) kabuk soyma işleminde kesilerek atılan alt bölgeye ait kısım	64
Şekil 3.14. A) Kesik pipet uçlarının görünümü B) Sodyum aljinat çözeltisi C) Aljinat çözeltisinde bekletilen eksplantlar D) Tek tek pipetle çekilen aljinat çözeltisi ve eksplantlar E) Eksplantların kalsiyum çözeltisine alınması F) Kaplama işlemi sırasında eksplantların görünümü G) Kaplanmış bir somatik embriyo H) Sentetik tohumların ekimi	68
Şekil 4.1. <i>C. graecum</i> türünde <i>in vitro</i> kültür koşullarında karşılaşılan akar zararlısı A) Besi ortamı üzerinde akar zararlısının oluşturduğu izler, B) Akar zararlısının gezdiği bölgelerde gelişmeye başlayan bakteriler, C) ve D) akar zararlısının binoküler altında görünümü	73
Şekil 4.2. A) <i>İn vitro</i> kütür başlangıcında karşılaşılan fungus kaynaklı enfeksiyonlar B) Alt kültürlerde ortaya çıkan bakteri kaynaklı enfeksiyonlar	74
Şekil 4.3. <i>C.persicum</i> türünde, ilk yıl çiçeklenme döneminde elde edilen SE yapıları A) Aynı eksplant üzerinde önce organogenik sonra embriyojenik yapıların gelişiminin gözlenmesi, B) SE yapılarının yakından görünümü.....	78
Şekil 4.4. <i>C. persicum</i> türüne ait somatik embriyo yapılarının gelişim aşamaları. A) Kallus yapılarından embriyoların oluşmaya	

- başlaması. B) Hormonlu ortamda çimlenmeye başlayan embriyolar. C) Köklerin oluşması. D) Hormonsuz ortama aktarılan çimlenmiş embriyo yapıları. E) Hormonsuz ortamda gelişmeye devam eden bitkicikler. F) Yumruların belirginleşmesi. G) Alıştırma aşamasına ulaşan bitkicik. H) Dikimi gerçekleştirilen somatik embriyo yöntemi ile elde edilmiş bir bitkicik..... 80
- Şekil 4.5. *C. persicum* türünde oluşmaya başlayan sürgün yapılarının A) 8. hafta ve B) 16. haftadaki genel görünümü 81
- Şekil 4.6. *C. persicum* türüne ait farklı genotiplerin oluşturduğu farklı kallus tipleri. A) Açık kahve-sarı renkli dağınık, pamuk dokulu kallus yapısı, genellikle organ oluşumu gözlenmemekle birlikte nadiren kök yapıları oluşturabilmektedir. B) Kahverengi kompakt kallus yapısı, sürgün veya kök oluşumu gözlenmekte, nadiren kallus olarak kalan yapılar C) Koyu kahverengi ve kompakt, ilerleyen alt kültürlerde karararak ölen kallus yapıları..... 82
- Şekil 4.7. *C. persicum* türüne ait iki farklı genotipin, 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP ortamında göstermiş oldukları farklı rejenerasyon tepkileri. A) Az miktarda koyu kahverengi kallus dokusu ve üzerinde gelişen sürgün yapıları ile B) Yoğun miktarda açık kahverengi kallus dokusu ve üzerinde gelişmekte olan kök ve sürgün yapıları..... 87
- Şekil 4.8. *C. persicum* türünde organogenesis aşamaları A) İlk 8 haftada farklılaşmaya başlayan kallus yapıları (B) 8-10 hafta arasında İlk yaprak taslaklarının ortaya çıkması (C) İkinci alt kültür aşamasında, 16. haftadaki yaprak gelişimleri D) Karanlık ortamda gelişmeye devam eden sürgün yapıları (E) 16-20. haftada aydınlık ortamda gelişen sürgünlerin görünümü. (F) 24. haftada

- aklimatizasyon aşaması için yeterli kök oluşumunu tamamlamış bitkicik 90
- Şekil 4.9. *C. persicum* türünde, 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren besi ortamında gözlenen embriyo yapıları (A) Somatik embriyoların bir arada görünümü, (B) Globuler aşamada bulunan embriyo yapıları, (C) Kalp aşamasında bulunan SE yapıları D) Torpedo aşamasında bulunan SE yapıları..... 91
- Şekil 4.10. Kök benzeri yapıların yer aldığı eksplant üzerinde globuler SE yapılarının ortaya çıkışı (1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ 2iP) 91
- Şekil 4.11. *C. persicum* türüne ait bir globuler embriyonun bitkiciğe dönüşümü. A) Çimlenerek kök yapısının oluşması, B) ve C) Yeni gelişmekte olan sürgün yapısı D) ve F) Yaprığın belirginleşmeye başlaması, F) Kök, yumru ve yaparak yapıları tam olarak oluşmuş bir bitkicik 92
- Şekil 4.12. İlk yıl çiçeklenme döneminde kültüre alınan iki farklı *C. graecum* genotipinde aynı BBD dozlarında gözlenen farklılıklar A) Sarı - açık kahverengi tonlarında dağılgan kallus yapısı, yeşil renkli kök benzeri yapılar, B) Koyu kahverengi kompakt yapıllı kallus, diğer genotipe nazaran daha uzun yapıda, açık kahverengi kök benzeri yapılar..... 102
- Şekil 4.13. Aynı BBD dozuna farklı tepkiler gösteren iki farklı *C. graecum* genotipi. Sol tarafta yer alan Genotip 1'e ait eksplantların tamamında kök ve sürgün yapısı gelişirken, sağ taraftaki Genotip 2'ye ait eksplantlardan, tüm BBD konsantrasyonlarında, yalnızca kallus yapıları elde edilebilmiştir 103
- Şekil 4.14. *C. graecum* türünde bir yıllık alt kültür sonrasında, kararmakta olan kallus yapıları üzerinde oluşmaya başlayan organojenik yapılar. (A) Aynı eksplant üzerinde hem sürgün hem kök benzeri

yapı oluşumu (B) Gelişmeye başlayan yaprak sürgünleri (C) Belirginleşen yapraklar	110
Şekil 4.15. Farklı <i>C. graecum</i> yumrularının rejenerasyon tepkilerine örnekler	115
Şekil 4.16. Dinlenme döneminde kültüre alınan <i>C. graecum</i> türünde, aynı eksplant üzerinde gözlenen kök ve sürgün gelişimi ile kök yapılarından gelişmeye devam eden kallus yapıları.....	116
Şekil 4.17. <i>C. coum</i> türünde gözlenen siyah renkli kompakt kallus yapıları A) Aynı petrideki eksplantların bir arada görünümü, B) Kallus yapısının yakından görünümü	118
Şekil 4.18. <i>C. coum</i> türünde gelişmeye başlayan embriyojenik kallus	121
Şekil 4.19. <i>C. coum</i> türüne farklılaşmaya başlayan embriyojenik kallus ve üzerinde oluşmaya başlayan globuler, kalp ve torpedo aşamalarındaki SE yapıları.....	121
Şekil 4.20. <i>C. cilicium</i> türünde elde edilen SE yapılarının görünümü A) Farklı gelişim evresinde bulunan somatik embriyoları B) Globuler aşamada bulunan SE yapıları C) Kalp aşamasında bulunan bir SE yapısı D) Torpedo aşamasında bulunan SE yapıları	125
Şekil 4.21. <i>C. pseudibericum</i> türüne ait eksplantların genel görünümü, A, B ve C) farklı BBD konsantrasyonlarında elde gözlenen siyah renkli kompakt kallus yapıları, D) <i>In vitro</i> kültürün 6. ayında kararına veya her hangi bir rejenerasyon gözlenmeyen eksplantlar, E) Bir kısmı kararmış eksplantlar	128
Şekil 4.22. <i>C. persicum</i> türünde kök benzeri yapılar ve sürgün yapılarının aynı eksplant üzerinde gelişimi	132
Şekil 4.23. <i>C. graecum</i> türünde farklı organojenik yapıların aynı eksplant üzerinde gelişimi, A) Eksplantın genel görünümü, B) Üzerinde	

emici tüyler bulunan kök benzeri yapılar (K) ile yaprak taslaklarının (S) yakından görünümü	132
Şekil 4.24. <i>C. persicum</i> türünde farklı genotiplerin aynı BBD konsantrasyonuna gösterdiği farklı rejenerasyon tepkileri.....	137
Şekil 4.25. <i>C. graecum</i> türünde farklı genotiplerin aynı BBD konsantrasyonuna gösterdiği farklı rejenerasyon tepkileri A) Açık renk, dağılğan yapıda kallus oluşumu ve zayıf kök gelişimi, B) Koyu renk kallus ve yoğun kök oluşumu, C) Koyu renk kallus ve zayıf kök gelişimi, D) Organojenik yapı elde edilemeyen yeşil - sarı renkli kompakt kallus yapısı.....	137
Şekil 4.26. İlk aklimatizasyon denemesinde, tüm bitkilerin kaybına neden olan fungus miselleri A) 2. günde belirgin olmaya başlayan miseller, B) 5. gün ve C) 8. günlerde bitkiciklerin hızlı ölümü	140
Şekil 4.27. Organogenesis ve embriyogenesis yöntemleri ile gelişen bitkiciklerin genel görünümü A) <i>C. persicum</i> türünde SE ile elde edilen yumrulu bir bitkicik B) <i>C. persicum</i> türüne ait organogenesis ile elde edilen bir bitkicik C) <i>C. graecum</i> türüne ait organogenesis yöntemi ile elde edilen yumrusuz bir bitkicik	141
Şekil 4.28. A) organogenesis yöntemi ve B) Embriyogenesis yöntemi ile elde edilmiş bitkiciklerin aklimatizasyon sonrası görünümleri	141
Şekil 4.29. <i>C. graecum</i> türünde elde edilmiş olan bitkicikler	143
Şekil 4.30. Enkapsülasyon denemesinde, <i>C. persicum</i> türüne ait çimlenme oranlarının haftalık değişimi.	145
Şekil 4.31. <i>C. persicum</i> türünde çimlenen sentetik tohumların görünümü	146
Şekil 4.32. Enkapsülasyon denemesinde <i>C. graecum</i> türüne ait rejenerasyon oranlarının haftalık değişimi	147
Şekil 4.33. <i>C. graecum</i> türünde kaplanmış sürgün uçlarının rejenerasyonu	148

- Şekil 4.34. *C. coum* türünde çimlenerek bitkiciğe dönüşen somatik embriyo üzerinde gelişmeye başlayan yeni somatik embriyo yapıları. S) Sürgün ve yaprak oluşumu, Y) Somatik embriyoların çimlenmesi ile oluşan yumru yapıları, K) Kök yapısı, SE) Oluşmaya devam eden somatik embriyo yapıları 149
- Şekil 4.35. Enkapsülasyon denemesine *C. coum* türüne ait çimlenme oranlarının haftalık değişimi 149
- Şekil 4.36. *C. cilicium* türünde, BBD içermeyen besi ortamında SE rejenerasyonuna devam eden somatik embriyo oranları 151
- Şekil 4.37. *C. cilicium* türünde A) Kontrol gurubu ve B) kaplama yapılan uygulamalarda gelişmeye devam eden SE yapıları 151
- Şekil 4.38. *C. cilicium* türünde kaplama materyalinin içerisinde gelişmeye devam eden somatik embriyo yapılarının yakından görünümü 152



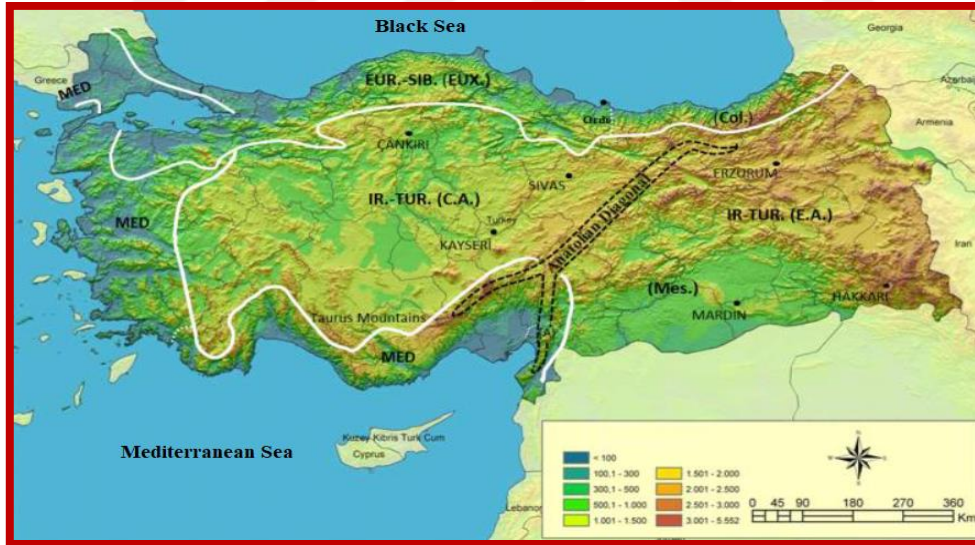
SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
®	: Registered
™	: Trademark
2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyacetic
2iP	: 6-(γ,γ -Dimethylallylamino) purine
ABA	: Abscisic acid
BA	: Benzyl Adenine (syn. 6-Benzylaminopurine)
BAP	: 6-Benzylaminopurine (syn. Benzyl Adenine)
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyici
cm	: Santimetre
Ca(ClO) ₂	: Kalsiyum Hipoklorit
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi
dk.	: Dakika
FeEDTA	: Demir Etilendiaminetetraasetik asit
g L ⁻¹	: Gram / litre (1 litrede çözüldüğü yer alan gram madde miktarı)
GTİP	: Gümrük Tarife İstatistik Pozisyonu
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HgCl ₂	: Cıva Klorür
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole butyric acid
KİN	: Kinetin
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
LS	: Linsmaier-Skoog
µM	: Mikromolar

μ l	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mg L ⁻¹	: Miligram/Litre (1litre çözeltide yer alan miligram madde miktarı)
mm	: Milimetre
MS	: Murashige and Skoog
NAA	: Naphthalen acedic acid
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit (syn: NaClO)
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PEG	: Poli Etilen Glikol
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PPM	: Parts Per Million (milyonda bir)
SE	: Somatik Embriyo
TLC	: Thin Cell Layer
TDZ	: Thidiazuron
Bölge	: Tez metninde “Bölge” kavramı sıklıkla, eksplant kaynağı olarak kullanılan yumrunun alt veya üst bölgesini tanımlamak için kullanılmıştır.
Dönem	: Tez metninde “Dönem” kavramı sıklıkla yumru eksplantlarının <i>in vitro</i> kültüre alındığı “çiçeklenme” ve “dinlenme” vejetasyon dönemlerini tanımlamak için kullanılmıştır.

1. GİRİŞ

Türkiye'nin; coğrafi konumu, jeolojik ve topoğrafik özellikleri, Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası bölgelerinin kesişme noktasında bulunması, farklı iklim bölgelerine sahip olması, üç tarafının denizlerle çevrili olması, step, orman, maki, kayalık, tuzcul vb. gibi farklı yaşam alanlarına sahip olması, zengin bitki çeşitliliği üzerine önemli rol oynamaktadır (Dölarıslan ve Gül, 2015; Arslan ve ark., 2015). Bunun sonucu olarak ülkemizde yaklaşık 12000 adet farklı takson (tür, alt tür, varyete vb.) bulunmakta olup, bu miktar Avrupa Kıtasının toplamına yakındır. Türkiye'nin yüz ölçümü, dünya yüz ölçümünün %0.53'ünü kaplamaktadır ancak ülkemiz florasında bulunan bitki türleri dünyada tanımlanmış bitki türlerinin %3.6'sını kapsamaktadır. Bu oran ülkemiz florasının ne kadar zengin olduğunu önemli bir göstergesidir (Arslan ve ark., 2015).



Şekil 1.1. Türkiye'nin fitocoğrafik bölgeleri (Mutun, 2016)

Ülkemiz, florasındaki bitki çeşitliliğinin yüksek olmasının yanı sıra endemik türler açısından da oldukça zengindir. Türkiye florasında yer alan bitkilerin yaklaşık

1/3'ü yalnızca ülkemizde doğal yayılış göstermekte olup, endemizm oranı %34'tür, bu oran birçok Avrupa ülkesinden (İspanya: %18.6, Yunanistan: %14.9, Fransa: %2.9 ve Polonya: %0.1) daha yüksektir (Dilaver, 2013). Son verilere göre Türkiye florasında yer alan 167 familyaya ait 11.707 farklı bitki taksonundan 3.649'u endemiktir (Güner ve ark., 2012; Arslan ve ark., 2015). Dünyada 34 biyoçeşitlilik noktasında bulunan bitkilerin %50'sinin endemik olduğu düşünüldüğünde, Türkiye'nin endemizm oranının da ne kadar yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır.

Türkiye bitki çeşitliliğinin önemli bir bölümünü, geofit adı verilen ve yılın büyük bir kısmını toprak altında soğan, yumru ve rizom gibi depo organları ile geçiren soğanlı-yumrulu bitkiler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalara göre Türkiye florasında bulunan yaklaşık 12000 türden 688 tanesinin geofitlere ait türler olduğu ve ülkemiz florasının % 6'dan fazlasını teşkil ettiği tespit edilmiştir. Bu yüzden, bazı kaynaklarda Anadolu, geofitlerin anavatanı olarak adlandırılmaktadır (Kalyoncu, 2007). Ülkemizde bulunan geofit türlerinden 162 tanesi endemiktir.

Türkiye'de bulunan geofit türleri, tarla açma, aşırı otlatma ve diğer tarımsal faaliyetler, sanayileşme, orman yangınları, yeni yol açma ve yol genişletme çalışmaları, izinsiz toplayıcılar gibi insan faaliyetleri nedeniyle tehdit altındadır. Uzun yıllardır gerçekleşmekte olan bu doğa tahribatı halen devam etmektedir. Bunun için ülkemizdeki gen kaynaklarının korunması, kültüre alınması ve adapte oldukları ortamlarda üretilmesi önem arz etmektedir. İnsan faaliyetlerinin yanı sıra hayvanlar da geofitlere zarar verebilmektedir. Ancak bu bitkilerin soğan, yumru ve rizom gibi depo ve vejetatif gelişme organlarının toprak altında olması diğer bitkilere kıyasla bir avantaj sağlamakta olup doğal bir korunma sağlamaktadır. Ayrıca bazı geofitlerin içerdiği zehirli bileşikler ve sahip oldukları özel koku ve tatlar onların hayvanlar tarafından yenmelerine engel olmaktadır (Koyuncu, 1994; Koçak, 2012).

Geofitlerin dolaylı yollardan zarar görmelerinin yanı sıra uzun yıllar boyunca doğal ortamlarından sökülerek ihraç edilmeleri pek çok türün tehlike altına girmesine neden olmuştur. Özellikle 1960 - 1990 yılları arası bu tahribat katlanarak

devam etmiş ve buna bağlı olarak dış satım sürekli olarak artış göstermiştir. Bu durum, dünya genelinde 21 ülkenin katılımıyla 1973 yılında imzalanan “nesli tehlike altında olan yabancı hayvan ve bitki türlerinin uluslararası ticaretini düzenleme anlaşması” (CITES-Convention on International Trade in Endangered species of Wild Fauna and Flora) ile değişmiştir. Türkiye CITES sözleşmesini 1996 yılında resmen kabul ederek “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine ilişkin yönetmelik” ile geofitlerin sökümü ve ticaretine sınırlama getirmiştir. İhracatı yasak olan çiçek soğanlarının cins ve türleri, doğadan toplama veya üretim yolu ile elde edilebilecek olan cins ve türler, bunların miktarları ve büyüklükleri gibi kriterler yönetmelik çerçevesinde oluşturulan Teknik Komite tarafından belirlenmekte ve ardından Resmi Gazete 'de yayınlanmaktadır (Aka Kaçar ve ark., 2013). Buna göre *Cyclamen coum*, *Cyclamen cilicium* ve *Cyclamen hederefolium* türleri dışındaki siklamen türlerinin doğadan toplanarak satışı tamamen yasaklanmıştır. *Cyclamen coum* türü için 700 bin doğadan söküm 250 bin üretim, *Cyclamen cilicium* türü için 200 bin doğadan söküm 300 bin üretim ve *Cyclamen hederefolium* türü için 200 bin doğadan söküm 3 milyon adet üretim sınırı belirlenmiştir. Aynı tebliğde bu üç türe ait ihraç edilecek yumruların çapları Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından bildirilmiştir (Resmi Gazete, 2016).

Geofitlerin tamamı tohumlu bitkiler (Spermatophyta) bölümünde yer alan, kapalı tohumlu bitkiler (Magnoliophyta) alt bölümünde yer almaktadır. Her ne kadar hem tek çenekli (Liliopsida) hem de çift çenekli geofitlere rastlamak mümkün olsa da, pek çoğu “tek çenekli bitkiler” sınıfında bulunmaktadır (Kalyoncu Doğan, 2007). Geofitler gelişimleri için elverişli olan dönemlerde toprak üstü organları ile gelişimlerini tamamlayarak yazın sıcaklıkların artması ile birlikte dinlenmeye girerler. Bu dönemi depo organlarında bulunan depo maddeleri ile toprak altında uykuda geçiren bitkiler, sıcaklıkların normale dönüp yağışların başlaması ile birlikte hızlı bir gelişme dönemine girerek yaprak ve çiçek yapılarını oluştururlar (Karagüzel, 2007). Geofitlerin toprak altı kısımları, yedek besin depo eden

kısımlarıdır. Bu nedenle geofitler, bu organların toprağa dikilmesiyle kolayca üretilirler (Koyuncu, 1994).

Geofitlerin çoğu 23° Kuzey ve 45° Güney enlemleri arasında yayılış göstermektedir. Geofitler açısından en zengin ülke, 2000 tür ile Güney Afrika'dır ve bu ülkeyi Akdeniz iklimine sahip ülkeler ve Amerika, Avustralya gibi ülkeler izlemektedir (Sevindik, 2018).

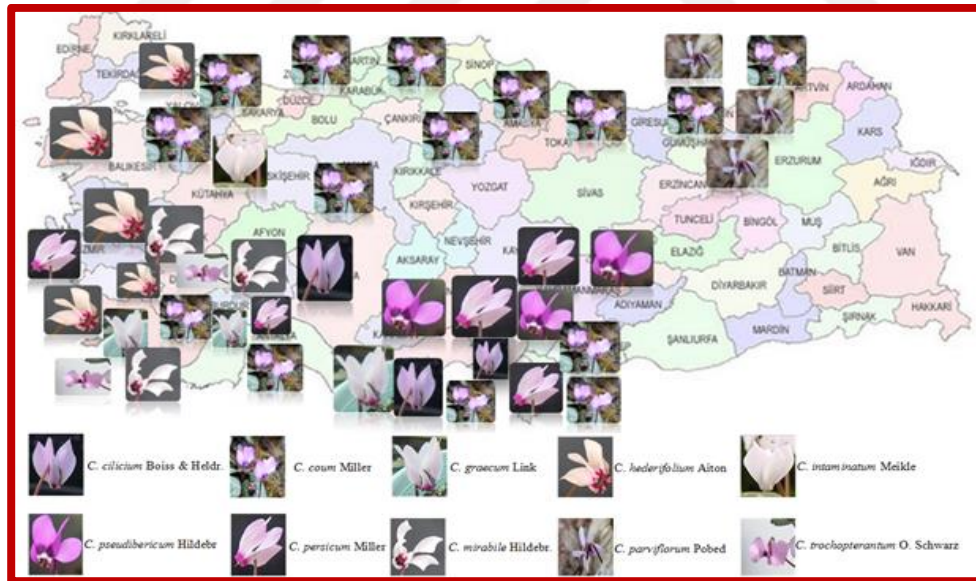
Daha çok süs bitkisi olarak bilinen geofitler bu kullanımının yanında endüstri bitkisi, tıbbi aromatik bitki ve doğrudan besin maddesi olarak kullanımı gibi farklı şekillerde insanlar tarafından değerlendirilmektedir. Geofitlerin ekonomik olarak öne çıkan en önemli kullanım alanı ise süs bitkileri sektöründe iç mekân, dış mekân, kesme çiçek ve doğal soğanlı süs bitkileri olarak kullanılmalarıdır. Süs bitkileri olarak geofitler, doğal çiçek soğanları adı altında sınıflandırılmakta olup, uluslararası ticarete 0601 GTİP (Gümrük Tarife İstatistik Pozisyonu) numarası ile işlem görmektedir. Dünyada yaklaşık 1 milyon 750 bin hektar alanda toplam 68 milyar 780 milyon 500 bin € değerinde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır (Kazaz 2016). Ülkemizde ise süs bitkileri üretimine ayrılan toplam alan 48.580 hektar olup, 4 milyar TL'lik üretim gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde son yıllarda yaklaşık 1.5 milyar adet /yıl süs bitkisi üretilirken, bu miktarın 25 milyondan fazlası doğal çiçek soğanlarına aittir (Anonim, 2017). Türkiye'de türlere göre ihracat oranlarına bakıldığında siklamen türünün yaklaşık %9'luk oranla önemli bir tür olduğu gözlenmektedir (Kazaz ve ark., 2015).

Siklamen günümüzde sıklıkla saksılı süs bitkisi olarak kullanılan ve ticareti uluslararası boyutta en çok yapılan bitki türleri arasında yer almaktadır (Seyring ve ark., 2009; Jalali ve ark., 2010). Özellikle son yıllarda bahçelerde kullanımı hızlı bir şekilde artmış ve pek çok üretici tarafından yetiştirilir hale gelmiştir (Grey-Wilson, 2002) Siklamen ilk kez 17. yüzyılın başlarında toplayıcılar tarafından Batı Avrupa'ya getirilmiştir. Ayrıca 18. yüzyıla kadar birkaç siklamen türünün kültüre

alındığı da bilinmektedir. Daha sonraki dönemlerde ekonomik değer kazanmış ve ıslah çalışmaları başlamıştır (Mathew ve Özhatay, 2001).

Myrsinaceae familyasına dâhil olan *Cyclamen* cinsi toplamda 20'den fazla tür ile temsil edilmekle birlikte net tür sayısı bazı kaynaklarda 22 (Grey-Wilson, 2002) bazılarında ise 21 (Compton ve ark., 2004; Yesson ve Culham, 2006; Seyring ve ark., 2009'dan) olarak bildirilmektedir. Orijini Akdeniz havzası olan *Cyclamen* cinsi ülkemizde 10 takson ile yayılış göstermekte olup (Çürük, 2013), bunlardan 6 tanesi ülkemize endemiktir (İzgu ve ark. 2016).

Siklamen bitkisinin doğal yayılış gösterdiği iller; Adana, Antalya, Amasya, Artvin, Aydın, Balıkesir, Bolu, Çanakkale, Giresun, İzmir, Konya, Mersin, Osmaniye, Rize ve Trabzon olarak sıralanabilir. Ülkemizde doğal yayılış gösteren siklamen türleri, ilkbaharda ve sonbaharda çiçek açan türler olmak üzere iki farklı guruba ayrılabilir.



Şekil 1.2. Türkiye’de *Cyclamen* türlerinin yayılış alanları (Mendi ve Çürük 2016)

Buna göre ilkbahar aylarında çiçek açan türler *Cyclamen alpinum* Dammann ex Spreng, *Cyclamen coum* Miller., *Cyclamen parviflorum* Pobed., *Cyclamen persicum* Miller., *Cyclamen pseudibericum* Hildebr., *Cyclamen trochopteranthum* O. Schwarz- türleriyken, sonbahar aylarında çiçeklenenler, *Cyclamen cilicium* Boiss ve Heldr., *Cyclamen graecum* Link., *Cyclamen hederifolium* Aiton., *Cyclamen mirabile* Hildebr. türleridir (Gündoğan, 2003). Ülkemize endemik olan türler ise; *Cyclamen parviflorum* Pobed., *Cyclamen pseudibericum* Hildebr., *Cyclamen cilicium* Boiss ve Heldr., *Cyclamen intaminatum* (Meikle) Grey-Wilson, ve *Cyclamen mirabile* Hildebr. türleri olarak bilinmektedir (Ekim ve ark., 1991).



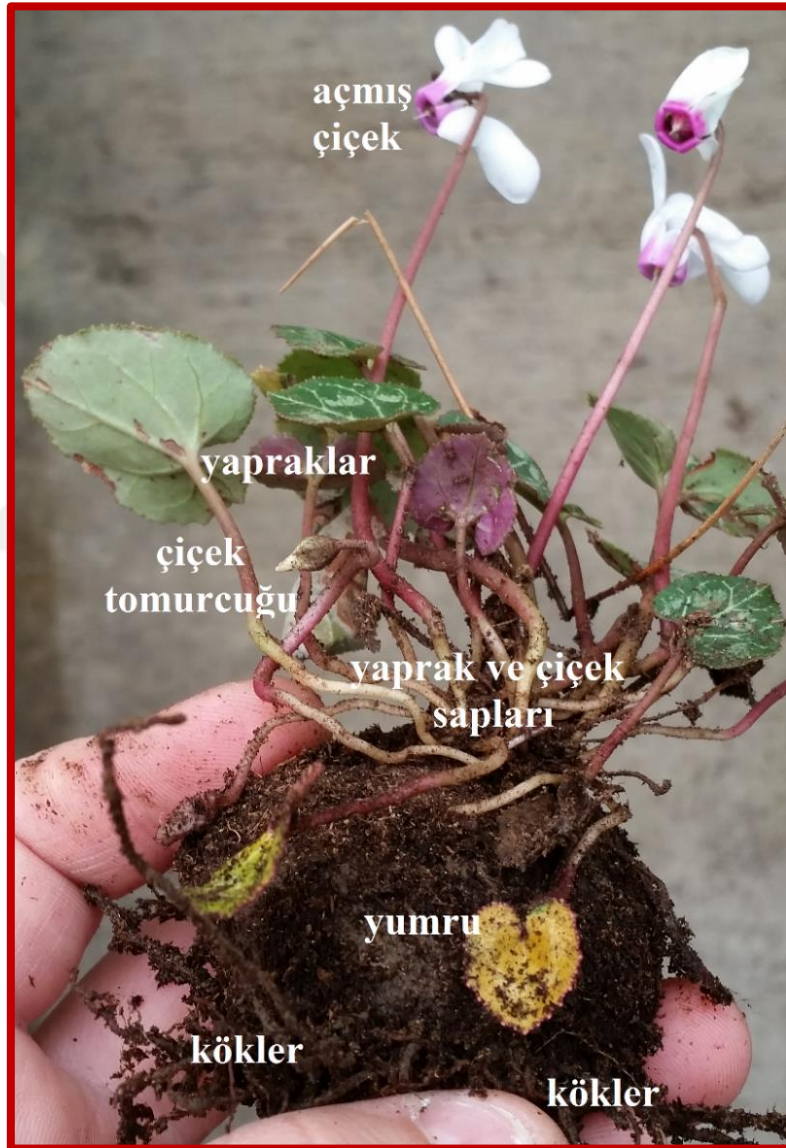
Şekil 1.3. Ç.Ü. Kampüsünde doğal yayılış gösteren *C. persicum* türü

Siklamen ismi bu bitkilere M.Ö. 370-285 yılları arasında yaşayan Theophrastus tarafından verilmiştir. *Cyclamen* ismi Latince “kuklamis”, “kuklamiren” sözcüklerinden türetilmiştir ve ismin kökeninin Latince de daire anlamına gelen “kuklos” veya “cyclos” kelimeleri olduğu düşünülmektedir. Bitkiye bu ismin verilmesinin sebebi ise meyve saplarının daire şeklinde helezonlar yaparak toprağa doğru uzanması veya toprak altı yumrularının yuvarlak ve yaprakların daire şeklinde olmasıdır (Tanker ve Türköz, 1984; Çürük, 2013). Siklamen türleri, ülkemizin farklı bölgelerinde “topalak, yer somunu, devetabanı, domuz turpu, domuz ekmeği, domuz ağırşığı, tavşankulağı, dağ menekşesi, siklamen, buhur otu, buhur Meryem, menekşe kökü, dana göbeği, kır menekşesi, köstebek, köstüköpen, köstüköpeği, kuskusa, tavşan paçası” isimleri ile adlandırılmaktadır (Çürük, 2013).

Bitki yapısı morfolojik ve fizyolojik olarak incelendiğinde, bitkinin çiçek saplarını döllemeden hemen sonra dairesel olarak kıvrıma başladığı, tohum kapsüllerini toprağa çektiği ve bitkiye doğal bir koruma mekanizması kazandırdığı görülmektedir. Böylece olgunlaşmakta olan tohum kapsülleri, güneş ve rüzgârın olumsuz etkilerinden uzaklaşmakta ve ayrıca otlayan hayvanlar tarafından yenilmesi önlenmektedir (Mathew ve Özhatay, 2001).

Cyclamen türleri otsu yapıda olup, toprak altı depo organları ve gövdeleri çok yıllıktır. Üzerlerinde gümüşü renkli desenler bulunan yaprakların sapları uzun, yaprak şekilleri ise dairesi oval veya kalp şeklindedir. Yaprakların renkleri açık veya koyu yeşilin farklı tonlarında olup, kenarlarında farklı şekillerde dişler mevcuttur. Her çiçek sapında bir adet bulunan çiçekler uzun bir çiçek sapının ucunda, öne doğru kıvrık şekilde konumlanmıştır. Çiçek sapları, döllemeden sonra meyvelerin olgunlaşmaya başlaması ile birlikte spiral şeklinde kıvrılarak toprağa doğru çekilmektedir. Sepaller beş loblu olup iç kısımdaki korolla kısa, yarım küre şeklinde tüplü eflatun, pembe veya beyaz renklidir. Uçtan geriye doğru kıvrık olan petaller merkezden dışa doğru hafif bir kıvrım oluşturmaktadır. Korollanın tabanında yer alan erkek organ 5 stamenlidir, filamentler çok kısa, anterler ise geniş olup koni

oluşturacak şekilde birbirlerine yakın konumda bulunmaktadır. Ovaryum üst durumda olup ince bir stilusa sahiptir ve stilus uzun olduğu için anterlerden yüksekte yer almaktadır. Yapışkan bir sıvı ile kaplı olan tohumlar ıslak ve yumuşak yapıda olup meyve kapsülü içinde tek tek konumlanmıştır (Davis, 1978, Çürük 2013).



Şekil 1.4. *Cyclamen* bitkisinin genel görünümü (*C. persicum*, Ç.Ü. Kampüsü)

Siklamen büyük oranda Akdeniz bölgesine ait bir genus olduğu için genel kültürel istekleri hakkında Akdeniz iklim özellikleri büyük fikir vermektedir. Siklamen türleri genel olarak don olaylarının az veya hiç görülmediği, ıslak ve soğuk kış ayları ile kuru ve sıcak yaz aylarına adapte olmuştur. Bunun yanında bazı türler ekstrem sayılabilecek koşullara uyum sağlamıştır. *C. coum*, *C. hederifolium*, *C. parviflorum* ve *C. purpurascens* türleri, -20°C soğuklara kadar dayanabilirken, *C. cilicium*, *C. intaminatum*, *C. mirabile* ve *C. alpinum* türleri ancak -14°C sıcaklığa kadar tolerans göstermektedir. Kültürü en çok yapılan tür olan *C. persicum* ise donma derecesinin altındaki sıcaklıklara uzun süre dayanmamaktadır (Grey-Willson, 2002). Genel olarak değerlendirildiğinde ise siklamen türleri için gerekli olan optimum iklim şartlarını şu şekilde sıralamak mümkündür. Gelişme döneminde gereksinim duyduğu sıcaklık aralığı, 15-20 °C, çiçeklenme döneminde ise 12-15 °C'dir. Yüksek sıcaklıkların çiçek oluşumunu olumsuz etkilediği ve bazı türlerde 25 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kaba ve büyük yaprakların oluştuğu gözlenmiştir. Gelişim % 70 oransal nemin olduğu durumlarda çok daha iyi olmaktadır (Çürük, 2013). Doğal şartlarda ağaç ve çalı gölgelerinde yayılış göstermekte olan siklamen türlerinin (Gündoğan, 2003) fotoperiyodizme duyarsız gibi davranmakla birlikte ışık yoğunluğundaki artış ve uzun gün durumunda çiçek tomurcuğu oluşumu teşvik edilmektedir. Bu nedenle çiçekli dönemlerde bitki aydınlık ancak direk güneş ışığı almayan bir yerde tutulmalı ve yaz aylarında % 60 oranında gölgeleme yapılmalıdır. Yetiştiricilikte erişkin bitkiler için 20000 lux, genç bitkiler için 60000 lux'lük aydınlatma idealdir (Çürük, 2013). Özellikle çiçekli dönemde çiçek kalitesini olumsuz etkilememek için alttan sulama yapılmalıdır. Drenajın iyi olmadığı veya ağır bünyeli hava almayan topraklarda kök gelişimi olumsuz etkilenir, bu gibi durumlarda üstten sulama yapmak yumrulara çürümelere neden olabilmektedir. Çiçeklenme sonrası sulama azaltılarak bitki dinlenmeye bırakılmalıdır (Boztok, 2002).

Diğer pek çok geofit türünde olduğu gibi, siklamen türleri de süs bitkisi olarak kullanımının yanı sıra, tıbbi değeri olan bitkilerdir ve pek çok ülkede alternatif tıp alanında halk tarafından kullanılmaktadır (Seyring ve ark., 2008; Özhatay, 2000; Yılcı, 2016). Bazı siklamen türlerine ait yumrular halk arasında kabızlık giderici, yatıştırıcı, sakinleştirici, bağırsak temizleyici ve anthelmintik olarak, leke ve güneş yanıklarından, çıban tedavisi, gut, görme bozukluğu, sarılık, zehirli hayvan ısırıkları ve hatta kısırlık tedavisine kadar pek çok hastalık ve rahatsızlığa karşı kullanılmıştır. (Mathew ve Özhatay, 2001; Yıldız ve ark., 2010; Altunkeyik ve ark., 2011; İzgü ve ark., 2016; Yılcı, 2016). Ayrıca yumrularında bulunan kristalin, saponin, antosiyanin ve organik asitler gibi sekonder metabolitler nedeni ile siklamen türleri kozmetik, ilaç ve kimya sanayinde hammadde olarak kullanılmaktadır (Yılcı, 2016). Çocuk felci tedavisinde kasları kuvvetlendirici olarak kullanılan, Nivalin adlı ilacın etken maddesi siklamen türlerinden elde edilmektedir (Mathew ve Özhatay, 2001). Yapılan çalışmalarda, siklamen yumrularında bulunan saponinlerin, sitotoksik, spermisit, antimikrobiyal, ağrı kesici ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. (Altunkeyik ve ark., 2011; İzgü ve ark., 2016). Aynı zamanda saponinler, nazal mukozada mukus ve nöropeptit salgılanmasını artırır. Bu yüzden bitki ekstraktı, rinosinüzit tedavisinde kullanılan burun spreyleri içeriğinde yer almaktadır (Yılcı, 2016). Yine bu yumrulardaki saponinlerin diüretik, antioksidan etkili olduğu ve kulak çınlamasında etki gösterdiği bildirilmektedir (Tanker ve Tanker, 1985). Ayrıca siklamen bazı bölgede sabun olarak da kullanılmaktadır (Yıldız ve ark., 2010). Bazı bölgelerde, yumrulardan kaynatılarak elde edilen suyun, tütün üreticileri tarafından zararlı toprak kurtlarına karşı biyolojik mücadele amacı ile kullanıldığı belirtilmektedir (Baytop, 1984).

Siklamen bitkisi, günümüzde süs bitkisi olarak sıklıkla kullanılan ve ticareti uluslararası boyutta en çok yapılan bitki türleri arasında yer almaktadır (Jalali ve ark., 2012). Sıklıkla saksılı süs bitkisi olarak ticareti yapılmakla birlikte (Seyring,

2009) bazı doğal türleri oldukça soğuk iklimlerde dış mekânlarda, ağaçlık yerler ve gölge alanlarla kaya bahçelerinde kullanılabilen (Jalali ve ark., 2012) veya kesme çiçek olarak değerlendirilmektedir (Winkelmann, 2010).

Ülkemizdeki süs bitkileri ticareti incelendiğinde, en önemli sektörel problemin üretim materyalindeki dışa bağımlılık olduğu görülmektedir. Bu problemin temelini oluşturan etmen ise süs bitkileri alanında gerçekleştirilen ıslah çalışmalarının yetersiz olması ve buna bağlı olarak sektöre yeni yerli çeşit girişinin çok az olmasıdır. Kendi üretim materyalimizin olmaması sonucunda her yıl ödemek zorunda olduğumuz ıslahçı hakkı (royalite) bedeli en büyük üretim gideri olarak dikkat çekmektedir. Yüksek royalite bedeli ülkemizdeki süs bitkileri üreticilerinin dünya piyasasındaki rekabet gücü azalmaktadır. Bunun sonucunda izinsiz çoğaltım gibi bir takım hukuki problemlere yol açabilecek başka sorunlar ortaya çıkmaktadır. Ancak süs bitkileri sektöründe talep edilebilecek verim ve kalite değerlerine sahip yerli çeşitlerin üretilmesi ile bu sektördeki sorunlar aşılabılır, dünya piyasasındaki üreticiler ile rekabeti sağlayabilecek düzeye ulaşabiliriz (Kazaz ve ark. 2015). Süs bitkileri alanında, ülkemizde yapılan ıslah çalışmaları incelendiğinde; sayısının yetersiz olduğu fakat son 15 yıl içerisinde bir gelişme sürecine girdiği ve geçtiğimiz 5 yıl içerisinde de belirli bir ivme kazandığı görülmektedir (Gülbağ, 2015). Ülkemizdeki siklamen ticareti incelendiğinde, özellikle son yıllarda, belirli boydaki siklamen fidelerinin ithal edildiği, bu fidelerin büyütülüp çiçeklenme aşamasına getirildikten sonra iç ve dış piyasaya satıldığı görülmektedir (Sevindik, 2018).

Doğal yaşam alanlarında tohum ile üremekte olan siklamen bitkisinin ticari varyeteleri de tohum yoluyla üretilmektedir. Siklamen türlerine ait bir bitki, bir vejetasyon döneminde yaklaşık olarak 20-30 adet çiçek oluştururken, her çiçekten ortalama 20 ile 50 arasında tohum elde edilmektedir (Sevindik, 2018). Siklamen türlerinde tohum ekiminden çiçeklenmeye kadar geçen süre, türlere göre farklılık göstermekle birlikte yaklaşık 150 gün geçmesi gerekmektedir ki, bu süre ıslah çalışmaları için oldukça uzundur. Siklamen, pek çok geofitten farklı olarak ayırma

veya yumruların kesilmesi ile çoğaltılamamaktadır. Siklamen kendileme depresyonu gösterdiği için, F1 hibritlerin ebeveyn hatlarının üretimi ve çoğaltımı zordur, elle tozlama yapıldığı için tohum maliyeti oldukça yüksektir. Bunların yanı sıra farklı ploidy seviyeleri, bazı genotipler arasında homojenite olmaması ve abortif embriyo oluşumları, yeni çeşitlerin klasik yöntemlerle geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle *in vitro* vejetatif çoğaltım özellikle ana baba hatların üretimi için ıslah çalışmalarının ayrılmaz bir parçası konumundadır. Ayrıca etkili ve ekonomik bir vejetatif çoğaltım gerçekleştirilirse, ıslahçılar üstün özellikte bitkileri selekte ederek klonal varyeteler üretebilirler. Bu nedenlerden bitki biyoteknolojisi, siklamen ıslah çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır ve klasik yöntemlerin yanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklamen türlerinin ticari olarak tohumla üretilmesine karşın doku kültürü çalışmaları, ıslah ve kitlesel üretim için önemli birer araç konumundadır (Takamura ve Miyajima, 1996, Winkelmann ve Schwenkel 1998, Winkelmann, 2010, Jalali ve ark., 2012).

Doku kültürü temelde rejenerasyon üzerine kurulu bir üretim yöntemidir. Diğer klasik yöntemlerden farklı olarak bitkilerin organ, doku ve hücre gibi parçalarının aseptik şartlarda, steril besi yerlerinde kültüre alınarak bu parçalardan organ, doku veya bir takım bitkisel ürünler elde edilmesi işlemidir. Rejenerasyonda başlangıç materyali olarak, meristematik doku, meristem içermeyen somatik dokular veya mayoz ürünü olan üreme hücreleri kullanılabilir. Doku kültürü teknikleri, hızlı klonal çoğaltım, hastaliksız bitki üretimi, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, haploid bitki eldesi, somatik embriyo ve sentetik tohum üretimi, protoplast kültürü ve füzyonu, gen kaynaklarının *in vitro* muhafazası, gen transferi, sekonder metabolit üretimi, *in vitro* döllenme ve türler arası melezlemelerde embriyo kurtarma gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Vidalie, 1995). Bu teknikler doğal bitki popülasyonu ve biyoçeşitliliğe en az zarar veren üretim yöntemidir. Buna ilave olarak fungus, bakteri ve zararlılar gibi etmenlerden arı büyük ölçülerde üretimler yapmayı mümkün kılmaktadır. Tıbbi amaçlarla kullanılmakta olan bitki ekstraksiyonlarının

iklim, hastalık ve çevre koşullarından bağımsız olarak üretilibilmelerini sağlamaktadır (Yamaner ve Erdağ, 2008).

İslah ve üretim amaçlı kullanılmasının yanı sıra *in vitro* rejenerasyon çalışmaları, farklı nedenlerle doğanın tahrip edilmesi sonucu tehdit veya geri dönüşü olmayan şekilde yok olma tehlikesi altında bulunan genetik kaynakların muhafazası için oldukça önemlidir (İzgü ve ark., 2016). *In vitro* muhafaza, doku kültürü koşullarında besi ortamının gücünü düşürerek ve sıcaklık, ışık gibi çevresel faktörleri modifiye ederek büyümenin yavaşlatılması esasına dayanır. Soğuğa tolerant olan bitkilerde sıcaklık 0-5°C arasında uygulanır. Bunun dışında kültür ortamında karbonhidrat kaynağı olarak sukroz, mineral elementlerin konsantrasyonları düşürülerek büyüme yavaşlatılabilir. *In vitro* koşullarda büyümenin yavaşlatılması esasına dayanan bu yöntem, pek çok bitki türünde çalışılmış olmakla beraber muz, patates ve cassava bitkilerinde genetik kaynakların *in vitro* muhafazasında rutin olarak kullanılmaktadır (Engelmann, 1997). Bunun yanında *in vitro* koşullarda elde edilmiş olan bitki materyalleri, ultra soğuk koşullarda da muhafaza edilebilmektedir. Sıvı azot içerisinde -196 °C'de gerçekleştirilen ultra soğuk muhafaza birçok avantajlar göstermektedir; kontaminasyon riski ve insan hatası azdır, depolama süresi uzatılabilir ve depolama daha az masraflıdır. Bu yöntem, doğal ortamda yok olma tehlikesi altında olan yabani türlerin depolanarak genetik çeşitliliğin korunmasında yardımcı olmaktadır. Özellikle embriyojenik hücreler, dondurularak muhafaza için uygun bir materyaldir (Winkelmann, 2010).

Son yıllarda süs bitkilerinin yaygın olarak doku kültürü ile çoğaltımı ticari olarak kabul görmüş ve bu alanda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Jalali ve ark., 2012). Siklamen türlerinin doku kültürü ile çoğaltımında *in vitro* rejenerasyon, organogenesis ve somatik embriyogenesis olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Üzerinde meristem dokusu bulunmayan bitki parçalarının uyartılması ile daha önceden mevcut bulunmayan kök ve sürgün gibi organ yapılarının oluşturulması adventif organogenesis olarak tanımlanmaktadır. Siklamen

türlerinde, organogenesis üzerine yapılan ilk çalışma Mayer'e (1956) ait olup günümüze kadar farklı siklamen türlerinde pek çok çalışma kayıtlara geçmiştir (Jalali ve ark., 2012). Organogenesis çalışmaları sürgün eldesi (caulogenesis), kök eldesi (rhizogenesis) ve mikro yumru oluşumu gibi alt kısımlarda incelenebilmektedir (Teixeira da Silva, 2016). Erken dönemde yapılmış olan çalışmalarda genel olarak siklamen yumruları kullanılmış olup, çalışmalar *C. persicum* türü ile sınırlı kalmıştır (Mayer, 1956, Stichel, 1959, Loewenberg, 1969, Okumoto ve Takabayashi, 1969). İlerleyen dönemlerde bu çalışmaları farklı siklamen türlerine ait toprak üstü organlarının ve *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş olan bitki materyallerinin kullanıldığı çalışmalar takip etmiştir (Teixeira da Silva, 2016).

Siklamende somatik embriyogenesis tekniği de etkili bir *in vitro* çoğaltma yöntemi olarak kullanılmaktadır (Kiviharju ve ark., 1992; Kreuger ark., 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Winkelmann ark., 2000). Somatik embriyogenesis, bitkinin somatik (vejetatif) hücrelerinin bir takım embriyojenik aşamalardan geçerek bütün bir bitki elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Siklamen türlerinde somatik embriyo yöntemi ile mikro çoğaltım çalışmaları pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Kreuger ve ark., 1995; Takamura ve ark., 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Seyring ve ark., 2009; Winkelmann ve ark., 2010; Koçak ve ark., 2014 ; İzgü ve ark., 2016; Tagipur ve ark., 2016). Yeni ve elit genotipler somatik embriyo yöntemi ile kısa sürede adına doğru olarak üretilebilmektedir. Somatik embriyo kullanımı büyük miktarda kitlesel üretimlerde, biyoreaktör, enkapsülasyon, dondurarak muhafaza, genetik transformasyon ve hızlı klonal çoğaltım çalışmalarında avantaj sağlamaktadır (Özcan ve ark., 2002; Jalali ve ark., 2012). Sıvı kültür ve biyoreaktör kullanımı ile elde edilen embriyojenik süspansiyon miktarını ve üretim hızını arttırmak mümkündür. Yapılan çalışmalar somatik embriyo oluşumunun dominant iki gen ile kontrol edildiğini göstermiştir (Winkelmann ark., 2004). Somatik embriyo oluşumu büyük ölçüde bitki genotipine

bağlı olmakla birlikte eksplant kaynağına, bitkinin fizyolojik durumuna ve besi ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerine göre değişim göstermektedir (Takamura ve ark., 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Özcan ve ark., 2002; Koçak ve ark., 2014). Somatik embriyo oluşumunun genotipe bağlı oluşu ve elde edilen embriyolarda görülen düşük çimlenme oranları bu yöntemin kullanımını kısıtlayan etkenler olarak sıralanabilir (Jalali ve ark., 2012). Somatik embriyolar da tıpkı döllenme yolu ile oluşmuş zigotik embriyolar gibi globular, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum safhalarını geçirmektedir. Diğer taraftan organogenesis yolu ile oluşan yapılardan farklılık gösterirler. Somatik embriyolar kök ve gövde eksenli olmak üzere iki kutuplu yapıya sahip olup, geliştirdikleri kallus dokusu ile vasküler bağlantıları bulunmaz ve bu nedenle kolaylıkla kallus dokusundan ayrılabilirler (Özcan ve ark., 2002).

Somatik embriyogenesis sonucunda oluşan ürün bir embriyo olup, zigotik embriyonun bir benzeridir. Dolayısı ile tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan somatik embriyo yapıları kaplanmış (sentetik) tohum olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Sentetik tohum kabaca, doku kültüründe üretilmiş olan somatik embriyo yapılarının (bazen kallus veya sürgün uçlarının) farklı şekillerde kaplanması işlemidir. Sentetik tohumun üretim amacı vejetatif üretim (üniformite) ile tohumla üretimin (taşıma, depolama, mibzer kullanımı) avantajlarını birleştirmektir (Winkelmann ve ark., 2004). Somatik embriyoların oluşumu aşamasında mayoz bölünme ve döllenme olmadığı için zigotik embriyolardaki gibi genetik açılma görülmez. Dolayısı ile somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumlarla gerçekleştirilen üretim bir klonal çoğaltımdır (Özcan ve ark., 2002). Somatik embriyo bazı özellikleri bakımından zigotik embriyodan farklılık göstermektedir. Zigotik embriyoyu dış etkilerden ve su kaybından koruyacak bir tohum kabuğu bulunmaktadır. Ayrıca zigotik embriyolarda besin sağlayacak endosperm (albuminous tohumlar) veya benzeri bir kotiledon yapı (nonalbuminous

tohumlar) vardır (Winkelmann ve ark., 2004). Sentetik tohumların hızlı klonal çoğaltımda kullanılabilmesi için başlıca (Özcan ve ark., 2002).

- 1- Çimlenme ve bitkiye dönüşüm oranları yüksek somatik embriyo yapılarından üretilmeleri,
- 2- İstenilen sayıda embriyo üretimini sağlayacak protokol ve sistemin geliştirilmesi ve son olarak,
- 3- Kültür sistemi ile kaplama işleminin entegrasyonunun sağlanması gerekmektedir.

Sentetik tohumlar, yaş tohumlar (hydrated) ve kurutulmuş (desiccated) tohumlar olarak iki tiptir. İlk sentetik tohum üretimi doku kültüründe üretilen somatik embriyo yapılarının basitçe hidrate edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. İlerleyen yıllarda koruyucu kaplama yöntemlerinin gelişmesi ile sentetik tohum kullanımı büyük aşama kat etmiştir. Yaş tohum üretiminde somatik propagüller (embriyo veya tomurcuklar) sodyum aljinat, agar, gelrite gibi hidrojelle kaplanır. En yaygın kullanılan jel, kalsiyum tuzları ile katılaşabilen sodyum aljinattır. Kurutulmuş tohumlarda ise somatik embriyo veya sürgün uçları polietilen glikolle (PEG) kaplanır ve steril şartlarda kurumaya bırakılır. Kuruyan karışım daha sonra *in vitro* kültür ortamına konarak re-hidrate edilir ve embriyolar böylece canlı tutulur (Çölgeçen ve Toker, 2006).

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal yayılış gösteren sıklamen türlerinin (*C. coum*, *C. cilicium*, *C. graecum*, *C. persicum*, *C. pseudibericum*) yumrularından somatik embriyo yapılarının elde edilmesi, bu yapılardan sentetik tohum üretilmesi hedeflenmiş ve ıslah çalışmaları ve gen kaynaklarının *in vitro* muhafazası konularına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışma süresince kullanılan türlerden ikisinin endemik (*C. pseudibericum* ve *C. cilicium*) diğer üç türün ise ülkemizde

doğal yayılış gösteriyor olması özellikle genetik kaynakların muhafazası bakımından çalışmaya ayrı bir önem kazandırmaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan doğal siklamen türlerinin yumrularında *in vitro* rejenerasyon denemeleri kurulmuştur. Bu denemelerde farklı hormonlar denenerek çiçeklenme ve dinlenme döneminde bulunan yumruların organojenik ve embriyojenik potansiyelleri incelenmiştir. Elde edilen somatik embriyolar kaplanarak sentetik tohumlar elde edilmiş ve çimlenme oranları test edilmiştir.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Siklamen Türlerine İlişkin *In vitro* Çalışmalar

Siklamen ticari olarak tohumla üretilmesine karşın doku kültürü ile üretim ıslah çalışmaları için vaz geçilmez bir araçtır (Winkelmann, 2010; Jalali, 2012) Siklamen türlerine ilişkin gerçekleştirilmiş olan kayıtlı ilk *in vitro* rejenerasyon çalışması, Mayer'e (1956) aittir. Bunu takip eden erken dönemde gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda genel olarak siklamen yumruları kullanılmış olup, çalışmalar *C. persicum* türü ile sınırlı kalmıştır (Mayer, 1956; Stichel, 1959; Loewenberg, 1969; Okumoto & Takabayashi, 1969). Bu ilk çalışmalarda daha çok öncelikle bakteriyel enfeksiyonu önlemeye daha sonra vejetatif çoğaltıma odaklanılmıştır (Jalali ve ark., 2012). *In vitro* siklamen çalışmalarında yumru parçalarının eksplant kaynağı olarak kullanılması halinde rejenerasyon oranının diğer organlara göre daha yüksek olduğu bu araştırmalarda belirtilmesine karşın (Geier, 1977; Ando ve Murasaki, 1983), enfeksiyon problemi araştırmacıları yumru kullanımından uzaklaştırmıştır. İlerleyen dönemlerde bu çalışmaları farklı siklamen türlerine ait toprak üstü organları ile *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş olan bitkilere ait aseptik organların kullanıldığı çalışmalar takip etmiştir.

Pek çok araştırmacı tarafından farklı siklamen türlerine ait somatik organlar kullanılarak organojenik yapıların elde edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar için sıklıkla *C. persicum* Mill. türü kullanılmış olup (Al-Majathoub ve Karam 2000; Karam ve Al-Majathoub 2000; Abu-Qaoud 2004; Jalali ve ark., 2012; Nhut, et al., 2012) bazı araştırmacılar bu türün yanında *C. mirabile* (Yamaner ve Erdağ 2008; Prange ve ark., 2008), *C. coum*, *C. hederifolium* (Prange ve ark., 2008; Seyring ve ark., 2009) *C. graecum* (Prange ve ark., 2008), *C. cilicium*, *C. purpurascens* (Seyring ve ark., 2009) türleri ile organogenesis çalışması yapmışlardır.

Somatik embriyogenesis yöntemi de özellikle *C. persicum* türünde pek çok araştırmacı tarafından etkin bir *in vitro* üretim sistemi olarak kullanılmıştır

(Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Winkelmann, 2010; Winkelmann ve ark., 2004; Koçak ve ark., 2014; Tagipur ve ark., 2016, İzgü ve ark., 2016).

C. persicum dışındaki somatik embriyogenesis çalışmaları kısmen sınırlıdır. Seyring ve ark. (2009) gerçekleştirdikleri çalışmada, *C. africanum* Boiss. and Reut., *C. cilicium* Boiss. and Heldr., *C. coum* Mill., *C. hederifolium* Ait., *C. persicum* ve *C. purpurascens* Mill. türlerini kullanarak embriyo benzeri yapılar elde etmişlerdir. Prange ve ark. (2010) ise *C. coum*, *C. alpinum*, *C. mirabile* ve *C. graecum* türlerinde somatik embriyo oluşumlarını incelemişlerdir. Benzer çalışmalar *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens* ve *C. rohlfsianum* gibi farklı siklamen türlerini kullanarak gerçekleştirilmiştir (Furukawa ve ark. 2001). İzgü ve ark. (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada, Türkiye’de endemik olan *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr. olmak üzere dört farklı siklamen türünde etkin bir somatik embriyo protokolü geliştirmişlerdir.

2.1.1. Siklamen Türlerinde *In vitro* Sterilizasyon

Mikro çoğaltımın başarısı eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, yetiştirme mevsimi) ile doğrudan ilişkilidir. Sterilizasyon aşaması, özellikle fungus etmenli kontaminasyon problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla, bitkilerin hijyenik koşullar altında yetiştirilmesi ile başlamaktadır. Ayrıca birlerinden tam olarak ayırt edilemeyen endojen ve ekzogen bakterilerin varlığı, yetiştirme koşullarına bağlı olarak ortaya çıkabilen, bir diğer enfeksiyon kaynağıdır. Bu nedenle, eksplantın alınacağı bitkiler kontrollü koşullara sahip seralarda yetiştirilmesi gerekmektedir.

Mikro çoğaltımda kullanılan eksplantlar, aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla steril edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri anaç bitkinin yetiştiği ortamın ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun

başarısını etkilemektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir (Doğan-Kalyoncu, 2007).

Mayer (1956) ve Stichel (1959) farklı dönemlerde yaptıkları çalışmalarında yumru parçalarını eksplant kaynağı olarak kullanmışlar ve bitki büyüme düzenleyicilerin tomurcuk ve kök oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar sterilizasyon prosedürünün çalışmanın en önemli adımını oluşturduğunu belirtip, toprak altı organ kullanımında başarıyı kısıtlayan en önemli faktörün enfeksiyon gelişimi olduğunu not etmişlerdir. Ayrıca Stichel (1959), sterilizasyon işleminde elde edilen başarının aylara göre değiştiğine dikkat çekerek en düşük enfeksiyon oranının haziran, en yüksek enfeksiyon gelişiminin ise kasım - ocak ayları arasında olduğunu tespit etmiştir.

Okumoto ve Takabayashi (1969) yumru dokusunun yüzey sterilizasyonundan etkilenmeyen endojen bakteriler tarafından bulaşık olduğunu ve bu nedenle pratik bir yöntem geliştirilmesi gerektiğine vurgu yapmışlardır. Çalışmalarında sterilizasyon aşamasına kürlenme (dış yüzey kahverengileşip mikrobiyal faaliyetler durana kadar kurutma) işlemini dâhil etmişlerdir. Çiçeklenmesi yeni bitmiş yumrular, öncelikle akan musluk suyu altında bekletilmiş ve ardından 30 dakika süre ile %14'lük NaOCl çözeltisi uygulanmıştır. Sonrasında, kabukları soyulan yumrulara tekrar aynı doz ve sürede NaOCl uygulaması yapılmıştır. Sterilizasyon işleminin ardından yumrular 1 cm çapında ve 1 cm boyunda kesilerek eksplantlar elde edilmiştir. Yumrular besi ortamına aktarılmadan önce 24, 48 ve 96 saat sürelerle kürlenme işlemine tabi tutulmuştur. Farklı kültür odası sıcaklıklarının enfeksiyon gelişimine olan etkilerinin de incelendiği çalışmada, kürlenme işleminin mikrobiyal faaliyetleri azaltarak oluşan tomurcuk miktarını arttırdığı tespit edilmiştir. Kürlenme işleminin 30 °C kültür odası koşulları ile birlikte uygulanması halinde en düşük enfeksiyon oranı elde edilmiş ancak bu sıcaklık eksplantların kararmasına neden olarak rejenerasyonu olumsuz etkilemiştir.

Loewenberg, (1969) kallus kültürü çalışması için siklamen yumrularını kullanmıştır. Sterilizasyon işlemi için öncelikle % 0.03 cıva solüsyonunda bir gece

bekletilen yumrular, % 1'lik NaOCl ile durulanmış ve ardından kabukları kazınarak (soyma) steril hale getirilmişlerdir. Araştırmacı, sterilizasyon başarısına ilişkin herhangi bir oran belirtmemiştir.

Geier, (1977) yüksek derecede iç bakteriler tarafından bulaşık olan yumru parçalarından üretim yapmanın zorluğuna değinmiştir. Farklı bitki organlarının kullanıldığı çalışmada bitki parçaları sterilizasyon için öncelikle musluk suyu ile bir süre yıkanmış ve 5 ila 10 dakika süre ile %3'lük NaOCl çözeltisinde bekletilerek ardından durulanmıştır. Bu aşamadan sonra yumruların dış kabukları soyulurken, diğer bitki parçaları direkt olarak % 0.03 dozunda cıva klorür içeren çözeltide bir gece beklemeye bırakılmıştır. Son olarak üç kez steril saf su ile durulanan eksplantlar farklı boyutlarda kesilerek ekim için hazırlanmıştır. Her hangi bir ilave işlem uygulanmaması halinde yaprak ve çiçek parçaları için başarılı olan bu işlemlerin yumru eksplantında uygulanması halinde enfeksiyon oranının, % 65 ila % 97'ye kadar çıktığı bildirilmiştir. Araştırmacı bakteri gelişimini tamamen önlemek için *in vitro* kültür boyunca antibiyotik kullanmak gerektiğini ancak bunun da rejenerasyonu olumsuz etkilediğini belirtmiştir. Bu nedenle çalışmada sterilizasyon aşamasına yumru parçaları için antibiyotikte bekletme ve kütleme işlemleri ilave edilmiş ve % 74 oranında başarı sağlanmıştır. Bunun için ekimden hemen önce yumru eksplantları, 24 saat süre ile 50 mg L⁻¹ Achromycin içeren suda tutulmuş, ardından 24 saat yarı açık petri kabı içerisinde steril kabinde kurutulduktan sonra ekim gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bir diğer denemede, kültüre alma işleminin ilk 1-4 günü ile 8 günü antibiyotikli, sonrasında antibiyotiksiz ortam kullanılmış ve sürenin uzaması ile enfeksiyonun da arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacı bu negatif interaksiyonun, dokuların uzun süre antibiyotiğe maruz kalması veya uzun süren diğer kültür koşulları nedeni ile bakteri hassasiyetinin artması sonucu olduğunu vurgulamıştır.

Ando ve Murasaki (1983) çalışmalarında dinlenme döneminden sonra 20 gün karanlıkta tutularak etiyolleşmesi sağlanan bitkileri kullanmışlardır. Sterilizasyon için 15 dakika süre ile % 1'lik aktif klorür kullanılmış ve yumruların

kabukları soyulmuştur. Denemede enfeksiyon oranı yumru eksplantında % 83, petiollerde % 12.5, etiyolleşmiş petiollerde ise % 0 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, siklamen bitkilerinin sağlıklı görünseler dahi sıklıkla endojen mikroorganizmalar tarafından enfekte durumda olduklarını ve bu mikroorganizmaların doku kültüründe eksplantın ölümüne kadar varacak sonuçlara yol açtıklarını not etmişlerdir. Sterilizasyon öncesi sıcaklık uygulaması (Okumoto & Takabayashi, 1969), antibiyotikte bekletme (Geier, 1977) veya antibiyotik içeren besi ortamlarının kullanımı (Stichel, 1959) dahi doku içerisinde yaşamakta olan bu mikroorganizmalara karşı kesin çözüm olamamıştır.

Murasaki ve Tsurushima, (1988) *C. persicum* cv. Vuurbaak ve *C. persicum* cv. Victoria kültür çeşitlerine ait etiyolleşmiş petiolleri eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Çalışma sonunda enfeksiyon oranını % 0 olarak bildiren araştırmacılar, etiyolleşmiş petiol kullanımı ile besi ortamında oluşan bakteri gelişimini tamamen önlediklerini belirtmişlerdir.

Devam eden çalışmalarda çoğunlukla toprak üstü organlar (Winkelmann ve ark., 2006; Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016) veya aseptik koşullarda çimlendirilerek yetiştirilmiş bitkilere ait organ parçaları tercih edilmiştir (Abu-Qaoud, 2004; Karam ve Al-Majathoub, 2010a; Yamaner ve Erdağ, 2008; Prange ve ark., 2010b; Jalali ve ark., 2012). Örneğin Winkelmann, (2010) somatik embriyogenesis başarısının yanı sıra düşük enfeksiyon oranı nedeni ile tozlanmamış ovulleri eksplant kaynağı olarak tercih ettiğini belirtirken, Naderi ve ark., (2012) yaprak ve yaprak sapı eksplantları için 15 dakika yıkama, % 70 alkolde 30 saniye bekletme, % 0.1 cıva klorür çözeltisinde 9 dakika bekletme ve ardından 8 dakika % 1 aktif klorür çözeltisinde bekletme ile % 100 başarıya ulaştıklarını bildirmiştir. Yakın tarihli yayınlarda sterilizasyona ilişkin vurgu yapılmamış ve bu yüzden önceki çalışmalar kısmında kısmen yeni olan yayınlara yer verilememiştir.

2.1.2. Siklamen Türlerinde Organogenesis Çalışmaları

Organogenesis çalışmalarında adventatif sürgün gelişimi için kotiledon yapraklar, kök, yumru, yaprak, yaprak sapı, etiyolleşmiş (düşük ışıkta uzamış) yaprak sapı, çiçek sapı ve taç yapraklar gibi çok farklı bitki kısımları kullanılmıştır (Jalali ve ark, 2012; Teixeira da Silva 2016).

Siklamen türleri üzerine olan ilk organogenesis çalışması, Mayer'e (1956) aittir. Çalışmada 8 mm boyutunda küp şeklinde kesilmiş yumru parçalarını eksplant kaynağı olarak kullanmış ve besi ortamına NAA ile adenin sülfat ilave ederek kök ve sürgün yapılarını elde etmiştir. Araştırmacı düşük ($0.005 - 0.2 \text{ mg L}^{-1}$) NAA dozlarında sürgün, yüksek dozlarda ise ($0.4 - 3.0 \text{ mg L}^{-1}$) kök ve ($2.0 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) kallus oluştuğunu bildirmiştir.

Stichel, (1959) ise Mayer ile paralel olarak NAA dozunun direk olarak organ farklılaşmasını etkilediğini, 0.3 mg L^{-1} altında sürgün, 0.5 mg L^{-1} üzerinde kök, $0.3-0.5 \text{ mg L}^{-1}$ arasında ise her iki organın bir arada geliştiğini tespit etmiştir. Bunun yanında NAA ile birlikte kullanılan adenin, guanin ve nikotinik asidin sadece organ sayısı ve kalitesine etkisi olduğunu organ farklılaşmasını etkilemediği belirtmiştir. Adenin, guanin ve nikotinik asidin ayrı ayrı kullanımlarında ise sadece sürgün yapıları elde edilmiştir. Çalışma süresinde elde edilen sürgün yapıları, NAA ($1.0 - 3.0 \text{ mg L}^{-1}$) içeren ortamlarda kolayca köklendirilmiştir. Ancak üzerlerinde kök yapılarının oluştuğu eksplantlar, sonrasında sürgün gelişimi için uygun olan besi ortamlarına alındığı halde hiçbir suretle sürgün gelişimi gözlenmemiştir.

Okumoto ve Takabayashi, (1968) çalışmalarında yumru eksplantlarını $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, sürekli veya gece/gündüz değişen sıcaklıklarda kültüre almışlardır. Çalışmada en yüksek sürgün ve en düşük nekroz oranı gün/gece $20 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklık koşulunda elde edilmiştir. Sabit veya değişen $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklık uygulamalarında ise kararmaların arttığı ve rejenerasyonun olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Araştırmacılar sürgün oluşumu için NAA'in 0.1 mg L^{-1} dozunda yalnız başına yeterli olduğunu, % 49 ile en yüksek sürgün oranına ise 1 mg L^{-1} NAA ile 20 mg L^{-1} adenin sülfatın bir arada kullanımı ile ulaşıldığını tespit etmiştir.

Araştırmacılar siklamen yumrularının uygun koşullarda sürgün ve kök oluşturma yetenekleri olduğu için, çalışmada dışarıdan BBD uygulaması olmaksızın organ oluşumlarının gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarına paralel olarak diğer pek çok araştırmacının da bitkinin sahip olduğu içsel hormonlar nedeni ile dışarıdan oksin uygulanmadan sürgün elde ettiğini, bu endojen oksin seviyesinin düşük olması halinde sürgün, yüksek olması durumunda ise köklenmenin gözlemlendiğini not etmişlerdir. Aynı zamanda, kültür başlangıcında yumruları steril saf suda uzun süre (1 saat) tutmanın difüzyonla dokulara su girişi olması nedeni ile oksin seviyesini azaltacağını bildirmişlerdir. Benzer şekilde kültür öncesi kürlenme (kurutma) uygulaması ile oluşan su kaybının nispi endojen BBD seviyesini yükselttiğini belirten araştırmacılar kürlenme uygulanan eksplantlarda sürgün oluşumunun bu nedenle arttığı ileri sürülmüştür.

Loewenberg (1969) siklamen yumrularını kullanarak kallus kültürü oluşturmuştur. Elde edilen kallus yapılarının 6 yılı aşkın bir süre ile alt kültür yapılarak muhafaza edildiğini ve bu süre içerisinde kallus dokularının organ oluşturma potansiyelini kaybetmediğini bildirmiştir. Çalışmada farklı karbon kaynakları (maltoz, früktoz, galaktoz, glikoz, gliserol, mannitol, sukroz) ve besi ortamları (Heller, Miller, Nitsch, MS) ile çalışılmıştır. MS ortamının seyreltilerek kullanılması ile daha yüksek kallus kütlelerine ulaşıldığı çalışmada karbon kaynağı olarak en iyi sonuç sukroz kullanımı ile elde edilmiştir. Kallus oluşumu için BBD olarak NAA (0,04 mg L⁻¹) ve SD 8339 (6-benzylamino-9-(tetrahydro-2-pyryl)-purine) kullanılmıştır.

Geier (1977) 1-1.5 yaşındaki siklamen hat ve ticari hibritlerine ait yaprak, petiol, yumru ve anter gibi farklı organları eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Nitsch ortamının kullanıldığı çalışmada örnekler ilk organojenik yapılar görülene dek tamamen karanlık ortamda 24 °C'de tutulmuş, organ yapılarının görülmeye başlamasından sonra 10000-15000 lux ışık şiddeti bulunan 15 saat aydınlık koşullarda çalışmaya devam edilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda yumru parçalarının rejenerasyon yeteneğinin diğer bitki parçalarına nazaran daha yüksek

olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan farklı hibrit ve hatlar arasında ise kayda değer bir farklılık tespit edilmemiştir.

Yumru eksplantları 0.5-2.5 mg L⁻¹ NAA ile 0.5-1 mg L⁻¹ KİN içeren ortamlarda kültüre alındığında, öncelikle kallus yapılarının geliştiği gözlenmiştir. Bunun yanında 0.1-0.5 mg L⁻¹ IAA ile 0.5 mg L⁻¹ KİN ilave edilmiş ortamlarda sürgün tomurcuğu, 2.5 mg L⁻¹ IAA'ın 0.5 ila 1 mg L⁻¹ KİN ile birlikte kullanılması halinde ise hem kök hem de sürgün tomurcuklarının oluştuğu bildirilmiştir. Farklı ortam bileşenleri kullanılarak yumrulardan % 100'e varan organ oluşumu elde edilebilirken, bu oran anterlerin eksplant olarak kullanıldığı ortamlarda % 25'lerde kalmıştır. 2,4-D'nin 0.1 ve 0.5 mg L⁻¹ dozları ile tek başına veya KİN ile kullanıldığında sürgün, 2.5 mg L⁻¹ dozunda tek kullanımında kök KİN ile kullanımında ise sürgün ve kök elde edilmiştir. Organ yapıları yumru eksplantlarından direk olarak gelişirken, diğer eksplant tiplerinde indirekt organogenesis gözlenmiştir. Elde edilmiş olan sürgün tomurcukları, NAA içeren ortamlarda köklendirilerek bitkiciğe dönüştürülmüş ve gelişimlerini sağlıklı bir şekilde tamamlayan bitkicikler dış koşullara aktarılmıştır.

Ando ve Murasaki (1983), gerçekleştirdikleri çalışmada, *C. persicum* cv. "Vuurbaak" çeşidine ait yumru ve petiolleri eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Çalışmada, NAA (0.1 - 0.2 µM) ve BA (1 µM) ile modifiye edilmiş farklı kuvvetteki (1/1, 1/3 ve 1/10) MS ortamında, karanlık ve aydınlık (2300 lux) koşulların sürgün ve kallus oluşumuna olan etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, karanlık koşulların aydınlık koşullara göre, 1/3 kuvvetindeki MS ortamının da 1/1 ve 1/10 kuvvetindeki ortamlara göre daha yüksek miktarda kallus ve sürgün oluşumunu desteklediğini bildirmişlerdir.

Wicart ve ark., (1984) *in vitro* koşullarda somatik dokulardan elde edilen yapılar ile tohum embriyosu ve bundan gelişen yapıları histolojik çalışma ile karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Deneme genelinde, kullanılan eksplant kaynağı ve hormon dozları bakımından farklılıklar gözlenmiştir. Bunun hücrelerin dış hormonlara karşı olan farklı tepkilerinden veya kendi sahip oldukları endojen

hormonların etkisinden olabileceğini belirten araştırmacılar, sürgün oluşumu için en uygun üretim materyalinin yumru parçaları olduğunu işaret etmişlerdir.

Murasaki ve Tsurushima, (1988) ıslah çalışmaları için çoğaltım katsayısını arttırmaya yönelik yaptıkları çalışmada etiyolleşmiş yaprak saplarını kullanmış ve bu şekilde ana bitkiye zarar vermeden ve tek bitkiden çok sayıda eksplant elde ederek yüksek üretim katsayısına ulaşmanın mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Etiyolleşmiş petiollerin normal petiollere göre daha fazla sürgün oranına ulaştığını belirten araştırmacılar eksplantların % 74'ünde sürgün elde etmeyi başarmışlardır. Elde edilen sürgünler, 0.1 mg L⁻¹ NAA içeren ortamda kültüre alınarak % 70 oranında köklenme elde edilmiş ve bu bitkilerin % 95'i sağlıklı olarak dış ortama alıştırılmıştır.

Dillen ve ark., (1996) *C. persicum* türüne ait kendilenmiş ıslah hatlarını (inbred lines) kullanarak uzun süreli kallus kültürü oluşturmuşlardır. Yüzevi kahverengi ve koyu renkli olan kallusların rejenerasyon yeteneğinin düşük olduğunu gözleyen araştırmacılar, açık sarı renkli kallusların yüksek organojenik potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada bu iki farklı kallus yapısının farklı eksplantlar üzerinde gözlenebildiği gibi, aynı eksplant üzerinde her iki tipteki kallusa rastlamanın mümkün olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, organojenik kallusların seçilerek devam edilmesi ile rastgele yapılan alt kültürlerle nazaran 3 kat daha fazla sürgün elde edilebildiğini kaydetmişlerdir. Ancak alt kültür süresi uzadıkça hem fenotip hem de genotip bakımından ana bitkiden farklı anormal bitkilerin gözlenmeye başladığı rapor edilmiştir. İlerleyen aşamalarda, fazla yaprak sayısına sahip olan sürgün yapılarının daha yüksek oranda kök geliştirdiği ve aklimatizasyon aşamasında daha yüksek yaşama oranına sahip oldukları gözlenmiştir.

Karam ve Al-Majathoub, (2000b) doğal yayılış gösteren *C. persicum* Mill. türü ile gerçekleştirdikleri çalışmada, yaprak ayası, petiol, petal ve çiçek saplarını kullanmışlardır. Kültür öncesi eksplantların bir kısmı 6 hafta boyunca karanlıkta tutularak çiçek ve yaprak saplarının uzaması sağlanmış ve bunlar etiyolleşmemiş eksplantlarla karşılaştırmalı olarak kültüre alınmıştır. Çalışmada, 1/3 kuvvetindeki

MS ortamına değişen oranlarda BA (0, 1, 2 ve 3 mg L⁻¹) veya TDZ (0, 0.0022, 0.022, 0.22 ve 2.2 mg L⁻¹) ilave edilerek organogenesis üzerine olan etkileri incelenmiştir. BA kullanımında hiçbir eksplant tipinde ve etiyolleşme uygulamasında sürgün elde edilememiştir. Benzer şekilde, yaprak ayası eksplantında da TDZ konsantrasyonuna bağlı olmaksızın her hangi bir gelişim gerçekleşmemiştir. En yüksek sürgün gelişimi 0.022 veya 0.22 mg L⁻¹ TDZ kullanımında çiçek sapı eksplantında ve 0.022 mg L⁻¹ TDZ kullanımı ile petal eksplantında gözlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuç 0.22 mg L⁻¹ TDZ kullanımında çiçek sapı eksplantından elde edilmiştir. eksplant tipi ve TDZ dozu rejenerasyon üzerine önemli derecede etkili bulunmuştur. Deneme genelinde etiyolleşmiş eksplantların etiyolleşmemiş olanlara kıyasla enfeksiyon oranı (% 0) ve rejenerasyon potansiyeli bakımından önemli derece üstün oldukları ayrıca rapor edilmiştir. En yüksek sürgün gelişim oranı % 74 ile 0.022 mg L⁻¹ TDZ kullanımı ile etiyolleşmiş petiol eksplantından elde edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, yumruların diğer eksplant tiplerine nazaran daha yüksek rejenerasyon yeteneği olmasına karşın, enfeksiyon riski ve besi ortamında devamlı süreyle antibiyotik kullanımı gerektirmesi (Geier, 1977) bakımından tercih etmediklerini belirtilmişlerdir. Çalışmada, eksplantlar arasında gözlenen yüksek rejenerasyon farklılığının, farklı dokulara ait hücrelerin bitki büyüme düzenleyicilere farklı oranlarda tepki vermelerinden, endojen büyüme düzenleyicilerden ve değişen oksin- sitokin oksidaz aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mohannad ve Karam, (2000) çalışmalarında *in vitro* koşullarda çimlendirilen 7 haftalık bitkilere ait kök, yaprak sapı, kotiledon yapraklar ve dört parçaya bölünmüş yumru eksplantları kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak ½ MS ortamına 0.1 mg L⁻¹ NAA ile 0, 1, 2 ve 3 mg L⁻¹ BA ilave edilmiştir. Çalışmada tüm eksplant tiplerinde sürgün ve kök oluşumları gözlenirken, en fazla sürgün oranı % 54 ile 2 mg L⁻¹ BA ilave edilen ortamda, yumru eksplantından gözlenmiştir. Benzer şekilde en fazla sürgün sayısı da eksplant başına 3.4 ile yumrulara gözlenmiştir. Araştırmacılar hormonsuz ortamda yalnızca yumru

eksplantında sürgün oluşumunu (% 13) gözlerken diğer eksplantlarda her hangi bir rejenerasyon olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte 2 mg L⁻¹ BA dozu yaprak sapı ve kotiledonlarda sürgün oluşumunu 1 mg L⁻¹ BA'ya nazaran düşürürken, 3 mg L⁻¹ BA dozu tüm eksplantlarda rejenerasyon üzerine olumsuz etki yapmıştır. Köklenme için ise sırası ile 0, 0.025, 0.5 veya 1 mg L⁻¹ oranlarında NAA veya IBA kullanılmıştır. Hormon ilave edilmeyen veya 0.025 mg L⁻¹ konsantrasyonunda BBD içeren ortamlarda köklenme gözlenmezken, 0.5 ve 1 mg L⁻¹ dozlarında sırası ile % 86 ve % 100 oranlarında kök elde edilmiştir. IBA veya NAA kullanımları arasında ise farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte dozun 1 mg L⁻¹'ye çıkartılması köklenme yüzdesini artırırken, kök miktarı ve uzunluğu üzerine etkili bulunmamıştır. Araştırmacılar diğer pek çok araştırmada da belirtildiği üzere BA, NAA kullanımının organogenesis üzerine etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, diğer eksplant tiplerinde sürgün meristemi bulunmadığı ve bu eksplantların endojen sitokinin seviyelerinin yumru parçalarına nazaran düşük olduğu için yumru eksplantının sürgün rejenerasyonuna daha yüksek oranda cevap verdiğini belirtmişlerdir.

Abu-Qaoud, (2004) çalışmasında *C. persicum* cv. Concerto çeşidine ait aseptik yumru, yaprak ve yaprak saplarını kullanarak mikro yumru ve sürgün oluşumu elde etmiştir. Çalışmada farklı dozlarda BA (1, 2, 3 mg L⁻¹) ve TDZ (0.11, 0.22, 0.44, 0.88 mg L⁻¹) 1 mg L⁻¹, NAA ile kombine edilerek kullanılmıştır. Kültür varyetesine ait steril tohumlar, MS ortamında çimlendirilmiş ve 1 ay sonra yumrular enine iki parça halinde, yapraklar dört parçaya bölünerek kullanılmıştır. Bir ay sonunda alınan gözlemlerde mikro yumru sayısı, eksplant başına yumru sayısı ve mikro yumru başına yaprak sayıları incelenmiştir. Farklı oranlarda BA (1 mg L⁻¹) ve TDZ (0.22 ve 0.88 mg L⁻¹) içeren ortamlarda, yumru eksplantından % 100 oranında sürgün elde edilmiş, en fazla yaprak sayısı 10.8 adet ile 0.88 mg L⁻¹ TDZ içeren ortamda elde edilmiştir. Yaprak saplarında rejenerasyon gözlenmezken, mikro yumru yapıları sadece yaprak eksplantından elde edilebilmiştir. En yüksek mikro yumru oluşturma oranı, % 58.3 ile 0.88 mg L⁻¹ TDZ içeren ortamdan gözlenmiştir.

% 41.6 oranında mikro yumru edilmiş olan 0.44 mg L⁻¹ TDZ içeren ortam ise 3 yumru/eksplant oranı ile en yüksek sayıda mikro yumru elde edilen BBD dozu olmuştur. Sitokinin içermeyen ortamlarda çalışma boyunca her hangi bir sürgün oluşumuna rastlanılmamıştır. Çalışma sonucunda, araştırmacı TDZ'nin BA'ya nazaran sürgün oluşumu üzerine daha etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmada elde edilen bitkicikler, % 30 başarı oranı ile sağlıklı bir şekilde dış ortama aktarılmıştır. Araştırmacılar, somatik embriyogenesis yönteminin en sık kullanılan *in vitro* üretim yöntemi olduğunu belirtmişlerdir. Ancak her genotipten cevap alınamaması nedeni ile üretimin sağlanamaması ve indirekt rejenerasyon (kallus) nedeni ile varyasyonun oluşması gibi nedenlerden dolayı, organogenesis yönteminin önemini vurgulamışlardır.

Prange ve ark., (2008) *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş *C. mirabile* Hild., *C. coum* Mill., *C. graecum* Link ve *C. hederifolium* Aiton türlerine ait kotiledon, yumru ve kök yapılarını eksplant kaynağı olarak kullanarak organogenesis çalışması gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, ½ MS ortamına 0.5 mg L⁻¹ NAA ve mg L⁻¹ 1.0 BAP veya 0.5 mg L⁻¹ IAA, 1.0 mg L⁻¹ BAP 1.0 mg L⁻¹ 2iP ve 1.0 mg L⁻¹ KİN ilavesi ile optimum sürgün gelişimi elde etmişlerdir. En uygun eksplant kaynağının türe bağlı olarak kotiledon veya yumru olduğunu belirten araştırmacılar, kök eksplantından daha çok kök yapılarının elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmada ayrıca aynı türe ait farklı genotiplerin ortamlara farklı tepkiler verdiği vurgulanmıştır. Bunun yanında düşük sitokinin kullanımında yüksek kök gelişimi gözlemlendiği ve bunun muhtemelen dokuda yer alan yüksek ekzogen oksin nedeni ile olduğu belirtilmiştir.

Yamaner ve Erdağ, (2008) çalışmalarında, Türkiye'de doğal yayılış gösteren endemik *C. mirabile* türünü kullanmışlardır. 8 haftalık steril bitkilere ait kök, yaprak, yaprak sapı ile bütün ve 4 parçaya bölünmüş yumruların eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada, sürgün ve mikro yumru elde edilmiştir. Çalışmada MS ortamının yanı sıra Loewenberg, Bourgin & Nitsch ve Linsmaier & Skoog ortamlarını kullanan araştırmacılar, bitki büyüme düzenleyicisi olarak NAA, IAA,

BA, KİN, TDZ ve 2,4-D'nin farklı kombinasyonlarını kullanmışlardır. Yaprak ve kök eksplantlarından her hangi bir rejenerasyon gözlenmezken, yaprak sapında % 25 oranında kallus gelişiminin gözleendiği ancak organ farklılaşmasının olmadığı bildirilmiştir. Dört parçaya bölünmüş yumru parçalarında ise en yüksek sürgün oluşum oranı, % 12.5 ile 0.1 mg L⁻¹ IAA ve 0.5 mg L⁻¹ KİN ilave edilmiş ortam ile 0.5 mg L⁻¹ NAA ve 0.5 mg L⁻¹ KİN ilave edilmiş olan ortamlarda sağlanmıştır. Bütün yumru parçalarının kullanıldığı denemede ise artan BA konsantrasyonunun sürgün gelişimini olumsuz etkilediğini bildiren araştırmacılar en yüksek sürgün gelişim oranının % 12.2 ile 1 mg L⁻¹ BA ve 0.1 mg L⁻¹ NAA ilave edilmiş ½ MS ortamında gözleendiğini, bu oranın 2 mg L⁻¹ ve 3 mg L⁻¹ BA kullanımında düştüğünü ifade etmişlerdir. Mikro yumru oluşumu için yalnızca BA'nın yeterli olduğunu bildiren araştırmacılar, 2 mg L⁻¹ BA kullanımı ile bütün yumru eksplantı başına 5.2 olan mikro yumru oluşum miktarının 0.1 mg L⁻¹ NAA ilavesi ile 6 adede çıktığını belirtmişlerdir. Göreceli düşük oksin dozlarının (<5 µM) mikro yumru oluşumu için daha uygun olduğunu bildiren araştırmacılar, yüksek dozların yumru oluşumunu azalttığını hatta bazen engellediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte mikro yumru oluşumunun diğer rejenerasyon tepkileri gibi yüksek oranda çevre, genotip ve uygulanan hormonlara bağlı olan kompleks ve değişken bir olay olduğunu bildirilmiştir. Rejenerasyonu teşvik etmek için alt ve üst kısımları kesilerek bütün halde kültüre alınan *C. mirabile* yumrularında BA içermeyen kontrol ortamı ile yalnız başına NAA içeren ortamlarda hiçbir gelişme sağlanamamıştır. Araştırmacılar pek çok çalışmada olduğu gibi siklamenin *in vitro* sürgün rejenerasyonu için BA'ya ihtiyaç duyduğunu belirterek optimum dozun 2 ila 3 mg L⁻¹ BA olduğunu bildirmişlerdir.

Bunun yanında araştırmacılar diğer pek çok çalışmada karşılaştığı gibi aynı bitkiden (genotipten) alınan eksplantlar arasında ciddi rejenerasyon farklılıkları tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bunun büyük oranda hücrelerin eksplant kaynağına bağlı olarak bitki büyüme düzenleyicilere verdikleri farklı tepkilerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında hücrelerin sahip olduğu

endojen hormon seviyeleri ile oksin sitokin oksidaz aktivitesinin de etkili olabileceğini rapor etmişlerdir.

Seyring ve ark., (2009) çalışmalarında farklı doğal siklamen türlerine ait (*C. persicum*, *C. coum*, *C. cilicium*, *C. purpurascens*, *C. hederifolium* ve *C. africanum*) yaprak, yaprak sapı, ovul ve çiçek sapı eksplantları ile organogenesis denemesi kurmuşlardır. 1.5 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ IAA ve 120 mg L⁻¹ adenin ilave edilmiş olan Nitsch Nitsch ortamında en yüksek sürgün oranı % 75 ile *C. africanum* yaprak eksplantından elde edilmiştir. Bunu % 50 sürgün oranı ile *C. persicum* ovul eksplantı ve *C. purpurascens* yaprak eksplantları takip etmiştir.

Nhut ve ark., (2012) *C. persicum* türü ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında eksplant kaynağı olarak Thin Cell Layers (TCL) tekniği ile 1mm boyutunda kesilmiş çiçek saplarnı kullanmışlardır. Araştırmacılar, MS ortamına 0.2 mg L⁻¹ TDZ ve 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ilave ederek % 100 oranında kallus oluşumu elde etmişlerdir. Kallus yapılarının 0.5 mg L⁻¹ BA ve 0.7 mg L⁻¹ IBA bulunan ortama aktarılmasıyla % 39.4 oranında sürgün gelişimi gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışmada TLC yönteminin *in vitro* rejenerasyona tepki vermeyen pek çok tür için oldukça ümit verici bir teknik olduğu belirtilmiştir.

Jalali ve ark., (2012) yapmış oldukları derlemede, *Cyclamen* türleri üzerine yapılmış olan doku kültürü çalışmalarını bir araya getirmişlerdir. Derlemede, ticari siklamen türlerinin tohum ile üretilmesine karşın *in vitro* çalışmaların siklamen ıslahı ve kitlesel üretimi için önemli bir enstrüman olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda, günümüze kadar siklamen üzerine yapılmış *in vitro* çalışmaların 2012 yılına kadar büyük ölçüde organogenesis konusu üzerine yoğunlaştığı, son dönemlerde ise somatik embriyogenesis ile ilgili çalışmalara ağırlık verildiği görülmektedir.

Teixeira da Silva, (2016) yapmış olduğu derlemede yalnızca organogenesis üzerine yapılan siklamen çalışmalarını ele almış ve yapılan araştırmaları 10'ar yıllık dilimler halinde incelemiştir. Derlemede, 1956 yılında Mayer ile başlayan *Cyclamen* türlerine ilişkin organogenesis çalışmalarının Nhut ve arkadaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmaya kadar devam ettiği görülmektedir.

2.1.2.1. Siklamen Türlerinde Mikro Yumru Elde Edilen *In vitro* Çalışmalar

Sürgün ve kök gelişiminin yanı sıra bazı araştırmacılar çalışmalarında mikro yumru yapılarının elde edildiğini de bildirmişlerdir. Yumru ve benzeri yapılar geofitlerin doğada yaz boyunca canlı kalabilmesini sağlarken ticari olarak, depo organların üretimi taşıma depolama ve dikim aşamasında tüm bitkiye kıyasla büyük avantajlar sağlar (Karam ve Al-Majathoub, 2000a)

Karam ve Al-Majathoub (2000a) çalışmalarında *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş aseptik fidelere ait 7 haftalık yumru, petiol, yaprak, kotiledon ve kök parçalarını eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Çalışmada, öncelikle damarlı, damarsız ve petiollü olarak farklı şekillerde kesilmiş yaprak parçalarının 0.1 mg L^{-1} NAA ve 0.22 TDZ içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında gelişimlerine bakılarak eksplant tipinin sürgün oluşumuna olan etkileri incelenmiştir. Bu denemede, damarsız yaprak parçalarında gelişim görülmezken, en yüksek rejenerasyon oranı damarlı yaprak ayalarında gözlenmiştir (% 88). Kurulan diğer denemede ise aseptik yumru, kotiledon, kök ve petiol eksplantlarının, NAA (0.1 mg L^{-1}) ve BA (0, 1, 2, 3 mg L^{-1}) içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında ve farklı sukroz dozlarında (30, 60, 90 ve 120 mg L^{-1}) mikro yumru oluşturmaları incelenmiştir. Denemede, yumru ve petiol eksplantında mikro yumru oluşmazken, en yüksek mikro yumru oluşturma oranı % 42 ile kök eksplantında (2.5 adet/eksplant) gözlenmiştir. Deneme bitki büyüme düzenleyiciler bakımından incelendiğinde, en yüksek yumru oluşturma oranı ve sayısı sıra ile % 20 ve 1.1 adet/eksplant ile 1 mg L^{-1} BA içeren ortamdan elde edilmiştir. Kök eksplantında bu oran, 1 mg L^{-1} BA içeren ortamda % 71, mikro yumru sayısı ise 4.6 adet/eksplant olarak bulunmuştur. Sukroz konsantrasyonu bakımından en yüksek mikro yumru oluşumu % 100 ile 30 mg L^{-1} dozdan elde edilmiştir

Sonuç olarak araştırmacılar, *in vitro* rejenerasyonun sukroz ve BBD konsantrasyonu, sabit veya hareketli kültür ortamı, eksplant tipi, bitki gelişim evresi ve kültür varyetesi (genotip) gibi faktörlerden etkilendiğini bildirmişlerdir. Özellikle eksplant tipleri arasındaki farklılığın hücrelerin sahip olduğu endojen hormon

seviyelerindeki farklılıklar ve hücrelerin dışarıdan uygulanan hormonlara farklı hassaslık seviyesinde tepki vermeleri nedeni ile olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Abu-Qaoud, (2004) *C. persicum* 'Concerto' çeşidine ait aseptik koşullarda çimlendirdiği fidelere ait, yaprak, yaprak sapı, yumru parçalarını eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. Sürgün gelişimi için en uygun eksplantın yumru parçaları olduğunun belirtildiği çalışmada, mikro yumru yapıları sadece yaprak eksplantından elde edilebilmiştir. En yüksek mikro yumru oranları sırası ile % 41.6 ve % 58.3 olarak 2 ve 4 µM TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Yamaner ve Erdağ, (2008) *in vitro* rejenerasyon için *C. mirabile* türüne ait aseptik yaprak, yaprak sapı, kök ve yumru parçaları ile bütün yumruları kullanmışlardır. En fazla mikro yumru (6 adet/eksplant), 2 mg L⁻¹ BA ve 0.1 mg L⁻¹ NAA içeren ortamlardan ve bölünmemiş yumrulardan elde edilmiştir.

2.1.3. Siklamen Türlerinde Embriyogenesis Çalışmaları

In vitro Somatik embriyogenesis bitkinin soma (vücut) hücrelerinin farklı şekillerde uyarılarak zigotik embriyonun geçirmiş olduğu aşamalara yönlenecek embriyo oluşturmalarıdır. Somatik embriyogenesis ile üstün genotiplerin kısa sürede adına doğru bir şekilde üretimine olanak verir. Ayrıca, kısa sürede kitlesel üretim, biyoreaktörler için embriyo üretimi, enkapsülasyon, kriyoprezervasyon, genetik transformasyon ve klonal çoğaltım bakımından avantajlar sağlarken, düşük çimlenme oranları somatik embriyo çalışmalarını kısıtlayan en büyük dezavantajdır. Somatik embriyogenesis çalışmalarının bir amacı da, generatif üretimin yerini alabilecek bir sentetik tohum prosedürünün oluşturulmasıdır. Bir diğer önemli amacı ise yüksek değere sahip bileşiklerin biyoreaktörlerde üretimi gibi özel kullanım alanlarına hizmet etmektir (Jimnez, 2001; Winkelmann ve ark., 2006; Bian ve ark., 2010; Winkelmann, 2010; Jalali ve ark., 2012, Tagipur ve ark., 2016).

Somatik embriyo oluşumu üzerine bitki büyüme düzenleyiciler, besi ortamının pH'sı kültür odası sıcaklığı veya farklı kimyasal uygulamaları etkilidir ancak geçerli bir uygulama henüz tespit edilebilmiş değildir. Genelde kullanılan

eksplantlardan düşük oranda somatik embriyo yapıları elde edilebilmektedir. Somatik embriyo gelişimi, Faz 0 (induction) ve Faz 1 (expression veya realization) olmak üzere iki aşamadan oluşur. İlk aşamada oksinli ortamda potansiyel hücreler ve hücre kümeleri oluşur, ikinci aşamada eksplant oksinsiz ortama alınır ve somatik embriyo yapıları ortaya çıkar (Jimnez, 2001; Winkelmann, 2010).

Somatik embriyo yapıları, 17 türde hormonsuz ortamdan, 29 türde oksin içeren ortamdan, 25 türde ise sitokinin içeren ortamdan elde edilmiştir. 2,4-D, en sık başvurulan oksindir (% 49) bunu % 27 ile NAA izlemektedir (Jimnez, 2001). Oksin uygulamasının somatik embriyo oluşumunu başlatmak için gerekli olduğu ve ortamdan oksinin uzaklaştırılması veya dozunun düşürülmesi ile somatik embriyo yapılarının ortaya çıktığı birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (Jimnez, 2001; Winkelmann ve Serek, 2005; Seyring ve ark., 2009; Winkelmann, 2010; Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016).

Siklamende somatik embriyogenesis, genotip, eksplant kaynağı, ortam bileşenleri, bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları ile kültür koşulları gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Winkelmann ve Serek, 2006; Jalali ve ark., 2010; Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016; Tagipur ve ark., 2016).

Siklamen türleri kullanılarak gerçekleştirilen somatik embriyo çalışmalarına en çok konu olan *C.persicum* türünde pek çok araştırmacı tarafından etkin bir *in vitro* üretim sistemi geliştirilmiştir (Takamura ve ark., 1995; Dillen ve ar., 1996; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Winkelmann ve ark., 1998; Furukawa ve ark., 2001; Seyring ve ark., 2009; Winkelmann, 2010; Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016; Tagipur ve ark., 2016). *C. cilicium* ve *C. mirabile* türleri üzerine yapılan somatik embriyo veya embriyo benzeri yapıların elde edildiği çalışmalar ise biraz sınırlıdır (Furukawa ve ark., 2001; Seyring ve ark., 2009; Prange ve ark., 2010a). Seyring ve ark., (2009) *C. africanum* Boiss. and Reut., *C. cilicium* Boiss. and Heldr., *C. coum* Mill., *C. hederifolium* Ait., *C. persicum* ve *C. purpurascens* Mill. türlerini kullanarak embriyo benzeri yapılar elde etmiştir. Prange ve ark., (2010a), *C. coum*, *C. alpinum*, *C. mirabile* ve *C. graecum* türlerinde somatik embriyo oluşumlarını

incelemişlerdir. Benzer çalışmalar, *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens* ve *C. rohlfsianum* gibi farklı siklamen türleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Furukawa ve ark., 2001; Tagipur ve ark., 2016).

Otani ve Shimada, (1991) ıslah materyali olarak kullanılan elit siklamen hatlarını üretmek amacı ile *C. persicum* cv. Table Mini Lilac Rose çeşidine ait yaprak parçaları ile somatik embriyogenesis denemesi kurmuşlardır. Çalışmada bitki büyüme düzenleyici olarak, 1 mg L^{-1} 2,4-D içeren Linsmaier-Skoog besi ortamına değişen oranlarda KİN (0, 0.1, 0.5, ve 1.0 mg L^{-1}) ilave edilerek somatik embriyo oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Yarı saydam renkli, dağılabilir ve opak beyaz renkli, kompakt olmak üzere iki farklı kallus yapısı gözleyen araştırmacılar, bu yapıları bitki büyüme düzenleyici içermeyen $\frac{1}{2}$ LS ortamına alarak somatik embriyoların oluşmasını sağlamışlardır. KİN dozunun artması ile birlikte kallus oluşum oranı artarken, somatik embriyo oluşumu azalmıştır. En yüksek somatik embriyo oranı, % 46.7 ile 0.1 mg L^{-1} KİN kullanılan ortamda elde edilmiştir. Dış koşullara alıştırıldıktan sonra çiçeklenen 200'ün üzerindeki bitkide her hangi bir morfolojik farklılığa rastlanılmamıştır.

Kreuger ve ark., (1995) *in vitro* koşullarda yetişmiş *C. persicum* 'Concerto Scarlet Othello' (S&G Tohum) çeşidine ait yumru parçalarını başlangıç materyali olarak kullanarak sıvı ortamda somatik embriyogenesis denemesi kurmuşlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak $25 \text{ } \mu\text{M}$ 2,4-D ve $5 \text{ } \mu\text{M}$ KİN ilave edilerek hazırlanan B5 ortamında BBD konsantrasyonu ilk hafta sonunda $1/5$, takip eden haftalarda ise $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilmiştir. Alt kültürden 8 gün sonra steril saf su ile hacminin 2 - 8 katı arası seyreltilen pro-embriyonik kültür, farklı delik çaplarına sahip eleklerle süzülerek bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS veya B5 ortamlarına aktarılmıştır. Farklılaşma ortamında en fazla tek embriyonun $150\text{-}300 \text{ } \mu\text{m}$ elek çapından süzülen süspansiyon kültüründe geliştiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, yumrunun daha küçük parçalar halinde kesilmesinin pro-embriyonik

kültür oluşumunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, ayrı şekilde kültüre alınan epidermis ve korteks kısımlarında rejenerasyon gözlenmemiştir.

Takamura ve ark., (1995) *Cyclamen persicum* 'Anneke' çeşidine ait aseptik kök, yumru, yaprak sapı ve kotiledon yapraklarını kullanarak somatik embriyogenesis çalışması gerçekleştirmişlerdir. Birbirlerinden bağımsız kurulan denemelerde, farklı dozlarda 2,4-D (0, 5.0 ve 50.0 µM) ve KİN (0, 0.5, 5.0 ve 50.0 µM) kullanımının yanı sıra değişen oranlarda sukroz (% 3, % 6 ve % 9), farklı kültür odası sıcaklıkları (20, 25 ve 30 °C), tamamen karanlık veya 24 saat aydınlık/karanlık uygulamalarının somatik embriyo oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Optimum bitki büyüme düzenleyici dozlarının eksplant kaynağına göre değiştiğini, özellikle yüksek doz oksin kullanımının rejenerasyonu olumsuz etkilediğini bildiren araştırmacılar, benzer şekilde % 9 sukroz dozunun gelişimi olumsuz etkilediğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar kültür odasının 25 ila 30 °C sıcaklıkları arasında ve tamamen karanlık olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Winkelmann ve ark., (1998) *Cyclamen persicum* cv. Purple Flamed çeşidine ait döllenenmiş ovulleri eksplant kaynağı olarak kullanarak süspansiyon kültürü kurmuşlardır. Süspansiyon kültürünü, düşük ışık ve hızlı SE üretimi gibi nedenlerle tercih eden araştırmacılar, 1 litrelik kültür ortamından 90.000 adet bitkicik elde etmenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir. ½ MS ortamına 2 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.8 mg L⁻¹ 2iP ilave edilmesi ile aynı kültür çeşidinden hem embriyojenik (kahverengimsi yumuşak yapılı) hem de embriyojenik olmayan (sarı renkli dağılgan) kallus yapıları elde edilmiştir. Embriyojenik kallus yapıları, embriyojenik olmayanlara nazaran daha hızlı kararmaya başladığı için 4 hafta olan alt kültür süresi embriyojenik kalluslarda 3 hafta ile sınırlandırılmıştır. Araştırmacılar, globuler aşamadaki embriyoların bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortama aktarıldığı halde baskın kök gelişimi veya düşük çimlenme gibi nedenlerle ilerleyen çalışmalarda çimlenme aşamasının optimize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Seyring ve ark., (2009) çalışmalarında farklı doğal siklamen türlerine ait (*C. persicum*, *C. coum*, *C. cilicium*, *C. purpurascens*, *C. hederifolium* ve *C. africanum*)

yaprak, yaprak sapı, ovul ve çiçek sapı eksplantları ile somatik embriyogenesis denemesi kurmuşlardır. 2 mg L^{-1} 2,4-D ve 0.8 mg L^{-1} 2iP ilave edilmiş MS ortamının kullanıldığı çalışmada, en yüksek somatik embriyo oranı, % 50 ile *C. africanum* ve *C. persicum*'un çiçek sapı eksplantından elde edilmiştir. Araştırmacılar, 2 mg L^{-1} 2,4-D ve 0.8 mg L^{-1} 2iP içeren besi ortamında somatik embriyo yapılarının yanı sıra sürgün yapılarının da elde edildiğini bildirmişler ancak oranları hakkında bilgi vermemişlerdir.

Prange ve ark., (2010a) *C. coum* türünde somatik embriyogenesis ve protoplast kültürü denemesi kurmuşlardır. Bunun için 10 farklı genotipe ait 1 cm^2 'lik yaprak parçaları, öncelikle 0.8 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} BA içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında 4-6 ay kültüre alınmıştır. Ardından embriyogenesis için 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP içeren ortama aktarılan örnekler içerisinde sadece bir genotipte embriyojenik kallus gözlenmiş ve çalışmaya bunun ile devam edilmiştir. Çalışmada protoplast ve somatik embriyo için katı ve sıvı olarak hazırlanan besi ortamlarına değişen dozlarda bitki büyüme düzenleyiciler, aktif karbon ve kalsiyum gibi maddeler ilave edilerek rejenerasyon üzerine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, *C. coum* türüne ait somatik embriyolarda elde ettikleri çimlenme oranının % 0 ila % 10 arasında değiştiğini ve bunun önceki çalışmalarda *C. persicum* türündeki çimlenme oranının çok altında olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada son olarak ploidi seviyeleri incelenmiş ve protoplast orijinli kalluslarda % 20, somatik embriyodan gelişen bitkilerde ise % 0.9 oranında tetraploid hücre tespit edilmiştir.

Winkelmann, (2010) *C. persicum* için geliştirdiği somatik embriyogenesis protokolünde, en uygun eksplant kaynağının tozlanmamış çiçeklere ait ovuller olduğunu bildirmiştir. Bunun için tamamen karanlık ortamda 2,4-D (2.0 mg L^{-1}) ve 2iP (0.8 mg L^{-1}) ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ MS besi ortamında kültüre alınan ovuller embriyojenik kallus yapılarının oluşmasının ardından bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Bu ortamda meydana gelen farklılaşma ve çimlenmenin ardından aydınlık koşullara alınan bitkicikler, 2 ila 4 ay içinde dış koşullara aktarılma seviyesine ulaşmıştır. Somaklonal varyasyon oranının çok az

olduğunu belirten araştırmacı, bu protokolün klonal çoğaltımın yanı sıra sentetik tohum üretimi, kriyoprezervasyon, genetik transformasyon ve protoplast rejenerasyonu için de uygun olduğunu bildirmiştir.

Jalali ve ark., (2010a) başlangıç materyali olarak *C. persicum* 'Halios' çeşidine ait yaprak ve yaprak saplarını kullanarak somatik embriyogenesis çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyici olarak, ½ MS ortamına 1, 2 ve 4 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0, 0.1, 0.5 mg L⁻¹ KİN ilave edilmiştir. Büyüklüklerinin 0.7 - 1 cm boyuta ulaşmasının ardından hormonsuz besi ortamına alınan kalluslarda 8 hafta sonra oluşan somatik embriyolar kaydedilmiştir. Şeffaf - yumuşak dokulu ve opak, beyaz - sert dokulu olmak üzere iki farklı kallus tipinin gözleendiği araştırmada, yaprak eksplantından yaprak sapına nazaran daha yüksek oranda kallus ve somatik embriyo elde edilmiştir. Kallus oluşumu bakımından deneme genelinde en yüksek oran 1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KİN dozunda elde edilirken, eksplant bazında bu dozlar yaprak için 1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KİN, yaprak sapında ise 1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ KİN olarak tespit edilmiştir. En yüksek somatik embriyo oranı da, 4 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ KİN kullanımı ile yaprak eksplantında gözlenmiştir.

Jalali ve ark., (2010b) *C. persicum* 'Halios' çeşidi ile gerçekleştirdikleri bir başka çalışmada, erişkin *ex vitro* bitkiye ait genç yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1, 2 ve 4 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0, 0.1, 0.5 mg L⁻¹ KİN kullanıldığı çalışmada, ayrıca MS ve ½ MS ortamları da karşılaştırılmıştır. Kallus oluşumu bakımından iki ortam arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmazken, somatik embriyo oranı bakımından ½ MS kullanımı daha olumlu sonuç vermiştir. Araştırmada en yüksek somatik embriyo oranı, % 9.1 ile 4 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ KİN ortamında elde edilmiştir. Oldukça yüksek oksin oranının somatik embriyo oluşumunu baskılaması beklenirken, elde edilen bu sonuç araştırmacılar tarafından dışarıdan uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerine karşı hücrelerin farklı hassasiyetlerde tepki vermesi olarak yorumlanmıştır.

Prange ve ark., (2010b) çalışmalarında *C. mirabile*, *C. graecum* ve *C. alpinum* türlerini kullanarak kallus, süspansiyon ve protoplast kültürleri ile elde

ettikleri somatik embriyo yapıları ile etkin bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Besi ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyici, CaCl₂ ve aktif karbon dozlarının somatik embriyo oluşumunu önemli düzeyde etkilediğini bildiren araştırmacılar, embriyojenik kallus oluşumu ve rejenerasyonunun büyük ölçüde genotipe bağlı olduğunu da belirtmişlerdir. Her tür için kullanılan 10 farklı genotipten *C. mirabile* ve *C. graecum* türünde 1, *C. alpinum* türünde ise sadece 2 adet genotip embriyojenik kallus oluşturmuştur. Bunun yanında pek çok eksplant 4 hafta içerisinde kararak ölmüştür. Çalışmada, *C. mirabile* türünde 0.5 g kallustan 1461 adet embriyo ve *C. graecum* türünde 1 g hücre süspansiyonundan 1.4×10^6 adede kadar protoplast izole edilmiştir. Deneme genelinde *C. mirabile* türünde düzgün şekilli, normal gelişen ve çimlenebilen somatik embriyo yapıları elde edilirken, *C. graecum* türünde elde edilen embriyolar kısa sürede kararmış ve vitrifikasyon (hyperhydricity) gözlenmiş, *C. alpinum* türünde ise bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda alt kültür yapılmasına karşın sekonder somatik embriyo gelişimi devam etmiştir. Sonuç olarak yalnızca *C. mirabile* türüne ait 169 adet bitkicik dış koşullara % 88 yaşama oranı ile aktarılabilmektedir.

Naderi ve ark., (2012) *C. persicum* 'Halios' çeşidine ait yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını kullanarak, ½ MS ve MS besisi ortamında somatik embriyo kültürü kurmuşlardır. Bitki büyüme düzenleyici olarak 4 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.1 mg L⁻¹ KİN kullanıldığı çalışmada, saydam dağılgan ve beyaz-opak sert yapılı olmak üzere iki farklı kallus tipi gözlenmiştir. Ortam etkisi kallus oluşumu üzerine önemli bulunmazken, yaprak eksplantında daha yüksek oranda kallus gözlenmiştir. En yüksek somatik embriyo, ½ MS ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir.

Koçak ve ark., (2014) çalışmasında Türkiye'de doğal yayılış gösteren *C. persicum* türünde, genotip ve farklı eksplant kaynaklarının somatik embriyo oluşumuna olan etkilerini incelemişlerdir. Çukurova Üniversitesi Kampüs alanından toplanarak kültüre alınmış olan bitkilerden 15 tanesi seçilerek bu bitkilere ait ovul, ovaryum, yaprak ve yaprak sapları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Besi ortamı olarak ½ MS ortamının kullanıldığı çalışmada, embriyojenik kallus oluşumu

için ortama Winkelmann (1998) tarafından önerilen dozlarda 2,4-D (2.0 mg L^{-1}) ve 2iP (0.8 mg L^{-1}) ilave edilmiştir. Çalışmada eksplant kaynağı ve genotip etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Araştırmacı en yüksek kallus oranının petiol kullanımı ile elde edildiğini ancak somatik embriyo oluşumu bakımından en yüksek oranın ovaryum eksplantında gözlendiğini bildirmiştir. Kullanılan 15 genotipin ortalamasına göre somatik embriyo oluşturma oranları sırası ile % 11.3 ovul, % 8.0 petiol, % 4.16 yaprak ve % 2.83 ovaryum olarak tespit edilmiştir.

İzgu ve ark., (2016) Türkiye’de endemik olan *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. parviflorum* Pobed., *C. mirabile* Hildebr. ve *C. pseudibericum* Hildebr. türlerinde etkin bir rejenerasyon protokolü geliştirmeye çalışmışlardır. Bunun için ovul, ovaryum, yaprak ve yaprak sapı olmak üzere dört farklı eksplant tipi ve 2,4-D (0, 1.0, 2.0 ve 2.5 mg L^{-1}) ile 2iP’nin (0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg L^{-1}) 13 farklı kombinasyonu kullanılmıştır. Embriyojenik kallus oluşturma yetenekleri tür ve eksplant tipine bağlı olarak değişim göstermiştir. En yüksek kallus oranı % 100 ile *C. pseudibericum* ve % 80 ile *C. mirabile* türlerine ait petiollerde gözlenmiştir, bunu sırası ile % 59 kallus oluşturma oranı ile *C. parviflorum* ve % 56 ile *C. cilicium* türlerine ait yaprak parçaları izlemiştir. Somatik embriyo benzeri yapıların gelişim oranları incelendiğinde, en yüksek oranın % 39 ile *C. pseudibericum* türüne ait petiollerde 2.5 mg L^{-1} 2,4-D ve 1.0 mg L^{-1} 2iP kullanımı ile elde edildiği görülmüştür. Bunu, % 32 ile *C. pseudibericum* türüne ait ovullerin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı 2.5 mg L^{-1} 2,4-D ve 1 mg L^{-1} 2iP ilave edilen besi ortamı izlemiştir. Elde edilen somatik embriyo benzeri yapıların oranları tür bazında ele alındığında bu oranların sırasıyla, % 38 ile *C. mirabile*, % 31 ile *C. cilicium*, % 16 ile *C. pseudibericum* ve % 15 ile *C. parviflorum* türlerine ait oldukları gözlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilmiş olan bitkicikler sırası ile *C. mirabile* türünde % 70, *C. pseudibericum* türünde % 63, *C. cilicium* türünde % 54 ve son olarak da *C. parviflorum* türünde % 25 yaşama oranları ile dış koşullara aktarılmıştır.

Tagipur ve ark., (2016) siklamen türlerinde somatik embriyo, kriyoprezervasyon ve *in vitro* mutasyon konulu yayınlarında somatik embriyonun

elde edilmesini ve gelişim aşamalarını açıklamış ve siklamen türlerinde somatik embriyo oluşumunu etkileyen etmenlere detaylı olarak yer vermişlerdir. Araştırmacılar somatik embriyogenesis üzerine başta genotip olmak üzere eksplant kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkili olduğunu belirtmişlerdir.

2.1.4. Sentetik Tohum Çalışmaları

Sentetik tohum terimi ilk kez 1970'lerde kullanılmaya başlanmıştır. Sentetik tohumlar, bitki propagülleri olarak adlandırılan *in vitro* koşullarda üretilmiş sürgün tomurcukları veya somatik embriyoların, sıklıkla sodyum aljinat ile kaplanması ile üretilmektedir. Temelde kurutulmuş (desiccated) ve yaş (hydrated) olmak üzere iki tip sentetik tohum bulunmaktadır ve kaplama sonrası rejenerasyonu arttırmak için, üretim aşamasında pek çok farklı uygulama kullanılabilmektedir (Çölgeçen ve Toker, 2006).

Winkelmann ve ark., (2004a) sentetik tohum üretiminde kullanılmak üzere *C. persicum* 'Purple Flame' çeşidine ait somatik embriyo yapıları ile kurutma ve rehidrasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu şekilde sentetik tohumların depolanma süresini uzatmayı hedefleyen araştırmacılar, farklı nispi nem değerlerinde kurutma ve iki farklı rehidrasyon yöntemini karşılaştırmışlardır. Çalışmada somatik embriyoların kurutma sonrası en az % 14 neme sahip olması gerektiği sonucuna varmışlardır. Kısa sürede sonuçlanan ani nem kaybının ve rehidrasyon işlemlerinin, somatik embriyo canlılığını azaltmasa bile çimlenme değerlerini dramatik şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir.

Winkelmann ve ark., (2004b) sıvı kültürde üretmiş oldukları *C. persicum* 'Purple Flame' çeşidine ait globuler aşamadaki somatik embriyo yapılarını kullanarak sentetik tohum üretmişlerdir. Çalışmada aljinat kapsül (klasik kaplama) ve boşluklu aljinat kapsülü olmak üzere iki farklı kaplama tekniği kullanılmıştır. Kurulan ikinci denemede örneklerin bir kısmı saf su ile hazırlanan sodyum aljinat ile bir kısmı ise kalsiyum içermeyen ½ MS ortamı ile hazırlanan sodyum aljinat ile kaplanmıştır. Kurulan son denemede ise örnekler +4 °C'de 4 hafta muhafaza

edildikten sonra çimlendirme ortamına aktarılmıştır. Çalışma sonunda kaplama işleminin çimlenmeyi geciktirdiği tespit edilmiştir ancak klasik kaplama işleminde 24 hafta sonunda çimlenme oranı kontrol ile aynı seviyeye ulaşmıştır. Boşluklu kapsül tekniğinde ise çimlenme oranı kısmen düşük kalmıştır. Bunun yanında, sodyum aljinatın besi ortamı ile hazırlanması halinde gözlem süresi sonunda çimlenme oranının arttığı görülmüştür. Soğukta muhafaza edilen somatik embriyolarda ise, klasik aljinat ile kaplanan somatik embriyolar ile kaplanmadan ekilen somatik embriyolar arasında çimlenme oranı bakımından bir farklılık gözlenmemiştir.

Seyring ve Hohe, (2005) kurutma işlemine ek olarak, *C. persicum* 'Purple Flame' çeşidine ait somatik embriyolarda polietilen glikol (PEG) ve absisik asit (ABA) uygulamalarının çimlenme üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bunun için embriyojenik kalluslara farklılaşma ortamında 75 mg L⁻¹ PEG ve 10 mg L⁻¹ ABA uygulamışlardır. Ardından, 4 farklı nispi nem değerine sahip aşırı doymuş tuz çözeltisi ile kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutma işleminin bazı sentetik tohum üretimi prosedürlerinde yer aldığını bildiren araştırmacılar, bunun aynı zamanda tohum gelişimi ve çimlenmesi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, kontrol grubunda % 4 olan çimlenme oranının ön uygulamalarla birlikte % 28'e kadar çıktığı gözlenmiştir.

Genomik, herhangi bir organizmanın yapısal ve işlevsel fonksiyonlarını kodlayan tüm genlerini tanımlarken, proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatır (Başaran ve ark., 2010). Bu nedenle somatik embriyo yapıları ile zigotik embriyoların proteomik açıdan karşılaştırılması, *C. persicum* türünde, SE yapılarında eksik olan endosperm dokuda, somatik embriyolardan farklı olarak hangi maddelerin bulunduğunu tespit etmek için önemli bir yere sahiptir (Winkelmann ve ark., 2006).

Winkelmann ve ark., (2006) gerçekleştirdikleri çalışmada, siklamen türlerine sentetik tohumun çimlenmesi için kalsiyum aljinat ile kaplamanın yetersiz olduğunu belirtmiş ve somatik embriyonun çimlenme mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için farklı embriyo yapıları üzerinde proteomik analiz yapmışlardır. Bunun için, zigotik embriyo, endosperm, çimlenmekte olan zigotik embriyo, 30 g L⁻¹ sukroz ile 60 g L⁻¹ sukroz dozlarında gelişen globuler somatik embriyo yapıları ile çimlenmekte olan somatik embriyolar arasındaki protein yapılarını iki boyutlu poliakramid jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonunda araştırmacılar, somatik embriyo yapılarını olgunlaştırmak için ABA gibi maddelerin kullanılmasının veya sentetik endosperm (aljinat kapsülü) içerisine ksiloglukan ilavesinin sentetik tohumların çimlenmesine katkı sağlayabileceği sonucuna varmışlardır.

Bian ve ark., (2009) somatik embriyo yapılarının gelişimini daha iyi ortaya koyabilmek için *C. persicum* türüne ait globuler ve torpedo aşamasında bulunan somatik embriyolar ile çimlenmekte olan somatik embriyo, zigotik embriyo ve embriyojenik olmayan kallus yapıları üzerinde proteomik analiz gerçekleştirmişlerdir. Örneklerden izole edilerek, iki boyutlu jel elektroforezinde tespit edilen yaklaşık 460 proteinden 35 tanesinin miktar bakımından önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, somatik embriyo kültüründe besi ortamına ilave edilen absisik asit benzeri maddelerin, hücre bölünmelerini azaltarak hücre farklılaşmasını teşvik ettiği ve somatik embriyoların olgunlaşması üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu olayın, absisik asit kullanımı ile bazı spesifik protein miktarlarının azalmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Buna dayanarak araştırmacılar somatik embriyo mekanizması üzerine özel bir takım proteinlerin direkt olarak etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Sevindik ve ark., (2019) sentetik tohum üretimi için başlarda sadece somatik embriyo yapıları kullanılırken, son zamanlarda rejenerasyon yeteneği olan her dokunun kaplama işleminde kullanılmaya başlandığını bildirmiştir. Araştırmacılar sentetik tohumun kolay ve ucuz taşınması, uzun süre depolama, gen kaynaklarının

muhafazası, kitlesel üretim, çevre şartlarından etkilenmeden haploid-dihaploid veya saf hat gibi elit materyallerin korunması gibi bir takım avantajlara sahip olduğunu ancak yüksek maliyet, doğal tohum kadar kolay taşınamaması gibi dezavantajları beraberinde getirdiğini belirtmişlerdir. Geofitlerde soğan, protokorm benzeri yapı ve tohum gibi yapıların sentetik tohum üretimi için kullanıldığı bildirilirken, geofitler üzerine yapılan çalışmaların henüz sebze ve meyve türlerindeki kadar fazla olmadığına değinilmiştir.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında, ülkemizde doğal yayılış gösteren *Cyclamen persicum* Miller, *Cyclamen pseudibericum* Hildebrand, *Cyclamen coum* Miller, *Cyclamen cilicium* Boissier & Heldreich ve *Cyclamen graecum* Link Türlerine ait yumrular eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu türlerden *Cyclamen cilicium* ve *Cyclamen graecum* türleri sonbaharda, *Cyclamen persicum*, *Cyclamen coum* ve *Cyclamen pseudibericum*, türleri ise ilkbaharda çiçeklenmektedir.

Bu materyallerden *C. pseudibericum*, *C. coum* ve *C. cilicium* türleri, TÜBİTAK 110O102 no'lu proje kapsamında toplanarak Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkileri serasında kültüre alınan bitkilerden temin edilmiştir. *C. persicum* ve *C. graecum* türleri ise proje kapsamında doğal yayılış gösterdikleri bölgelerden toplanmıştır. Türlerine göre bitkisel materyaller; *C. persicum*; Adana Merkez, Çukurova Üniversitesi kampüs alanı, *C. graecum*; Antalya Kemer, *C. coum*; Osmaniye Ürün Köyü, Çiftmazı Köyü ve Zorkun Yaylası, *C. pseudibericum*; Adana Aladağ ve Feke, *C. cilicium*; Adana Aladağ ve Pozantı bölgelerinden, her bir lokasyondan 50 adet olacak şekilde toplanmıştır.



Şekil 3.1. Bitkisel Materyalin Toplanması. A) Çukurova Üniversitesi Kampüs alanında yayılım gösteren bitkilerin yumruları ile birlikte çıkartılması. B) Çiçekli bir *C. persicum* türünün genel görünümü. C) Bitkilerin Seraya getirilerek saksılara aktarılması

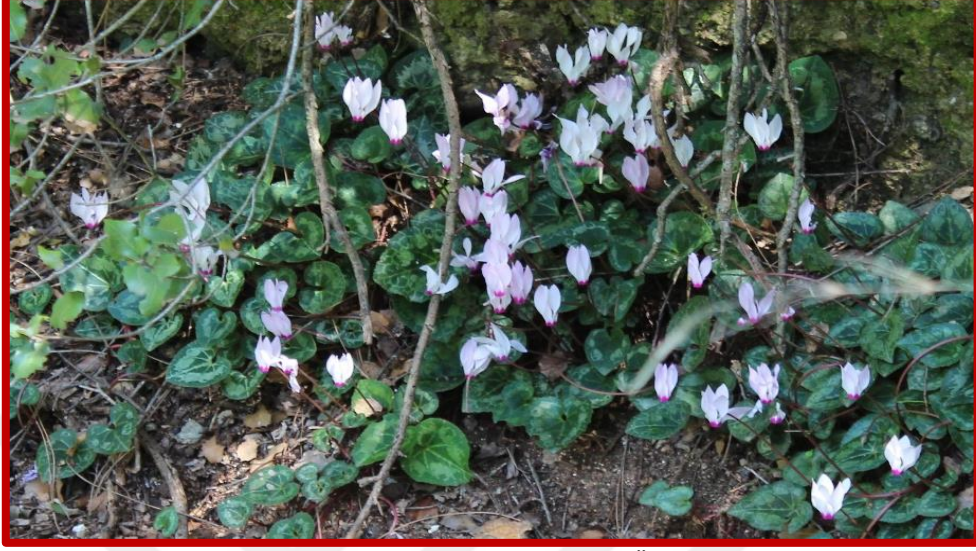
Bitkisel materyaller vejetasyon periyodu içerisinde, yapraklı ve bir kısmı çiçekli halde yumruları ile birlikte toplanılarak Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümünde bulunan süs bitkileri serasına getirilmiştir. Kök bölgelerinde bulunan toprakları temizlenen ve kökleri budanan bitkiler, içerisinde önceden hazırlanmış torf: perlit : kum (1:1:1) karışımı bulunan 17x15x13 cm ebatlarındaki 3 litrelik üretim saksılarına dikilmiştir. Saksılar tezgâhların üzerine yerleştirilmiş, doğal yetiştirme ortamlarına uygun olacak şekilde seranın üzeri % 40'lık gölge tülü ile gölgelenmiştir. Sulama işlemi, haftada bir kez, 300 ml/saksı olacak şekilde musluk suyu kullanılarak yapılmıştır. Gübreleme işlemi iki ay ara ile EC değeri 1.5-1.8 mS/cm olacak şekilde 15:10:30 NPK kompoze gübre ile hazırlanan sulama suyu ile gerçekleştirilmiştir. Kurulan *in vitro* denemelerde fungus hastalıklarının yoğun görülmesinin ardından çalışmanın ikinci yılında bitkilere sulama suyu ile birlikte 30 ila 60 gün arasında değişen sürelerde 250g/100litre dozunda fungusit (%50 Captan) uygulanmıştır.

3.1.1. *Cyclamen persicum* Miller

Süs bitkileri sektöründe ticareti yapılan kültür formlarının ebeveyni olan *Cyclamen persicum* türü, Türkiye'nin güney ve batısında doğal olarak yetişir. Ülkemiz dışında Yunanistan, Suriye, Lübnan, İsrail, Ürdün, Kıbrıs, Rodos, Kerpe ve Girit Adalarında, Cezayir ve Tunus'ta yayılım gösteren tür, Türkiye'de özellikle Çukurova Havzası ve Hatay illerinde yoğun yayılım göstermektedir. Aralık ayında başlayan çiçeklenme Mayıs ayına kadar devam eder. Bu türe ait ticari çeşitlerde pek çok farklı çiçek rengi ve formu olmakla birlikte, doğal formları genellikle beyaz veya pembenin değişik tonlarında olabilmektedir. Petallerin dip kısmı (çiçek merkezi) koyu pembe veya kırmızı tonlarındadır. Bazı genotiplerde çiçeğin uç kısmına doğru renkte değişim veya beneklenme görülebilmektedir. Yumru yapısı, küre veya basık küre şeklinde olup, yumruların 15 cm çapına ulaşabildiği bilinmektedir. Soğuğa karşı hassas olan *C. persicum* türünün kromozom sayısı, $2n=2x=48$ 'dir. Tez çalışması kapsamında bu tür, ihtiyaç duyulduğu dönemlerde, *in vitro* kültüre alınmadan birkaç gün önce toplanılmıştır.



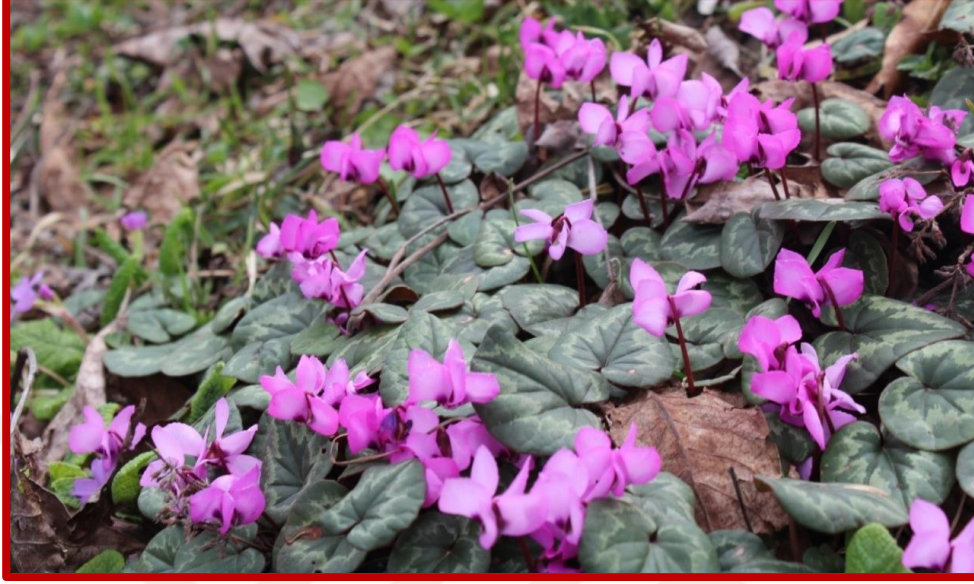
Şekil 3.2. *C. persicum* türünün toplandığı kampüs alanı



Şekil 3.3. Doğal yayılış alanında *C. persicum* türü (Ç.Ü. Kampüsü, Adana)

3.1.2. *Cyclamen coum* Miller

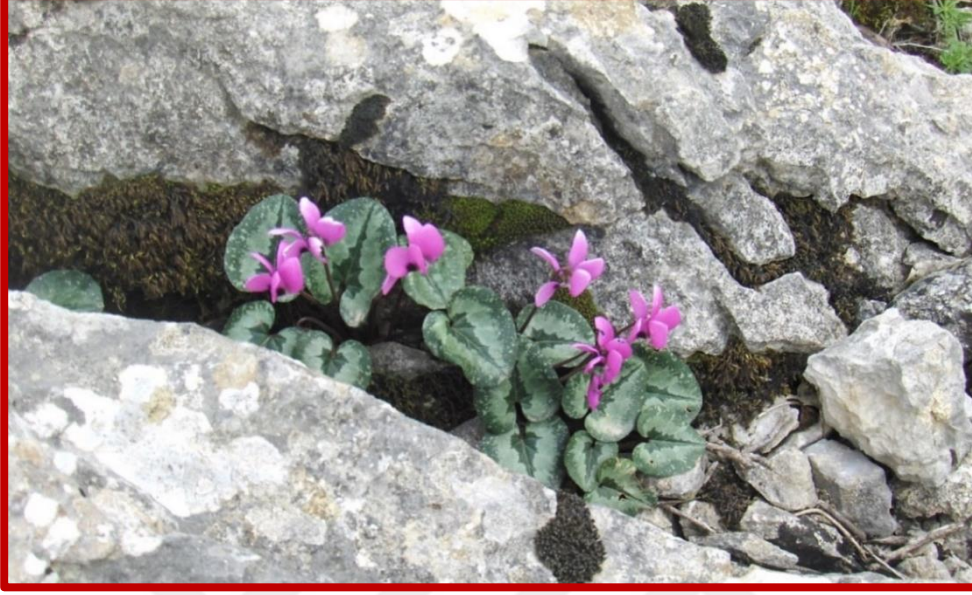
İki temel yayılış alanına sahip olan *C. coum* türü, Türkiye'nin güneyinde bulunan Toros dağlarından İsrail'e kadar olan Akdeniz havzası ile Trakya'da Istranca dağlarından Karadeniz kıyısı boyunca Kırım, Kafkasya ve Karadeniz bölgesini çevreleyen dağlara kadar geniş bir alanda yayılım gösterir. Doğu Karadeniz bölgesinde *Galanthus woronowii*, *Cyclamen parviflorum* ve *Primula* sp. ile birlikte yayılış göstermektedir. Kasım ayının sonunda çiçeklenmeye başlayan türde, nisan ayının ortalarına kadar çiçekler görülmeye devam eder. Pembe ile açık veya koyu kırmızı olan çiçeklere sahip olan türde, beyaz çiçek rengine yok denecek kadar az rastlanılmaktadır. Diğer siklamen türlerine nazaran küçük olan yumru çapı, 5 cm çapına kadar ulaşabilmektedir. Deniz seviyesinden 2135 m'ye varan yüksekliklerde, kızılçam ormanlarında, çalılık ya da bodur ağaçlarla kaplı humusça zengin nemli bölgelerde yayılış gösteren bu türün, en önemli özelliği soğuğa dayanımıdır. Bu özelliği nedeni ile *C. persicum* türünden ayrılan tür süs bitkileri sektöründe dış mekân süs bitkisi olarak kendine yer bulmaktadır. Kromozom sayısı $2n=30$ olarak bilinmektedir.



Şekil 3.4. Doğal yayılış gösteren *C. coum* türü (Mendi ve Çürük, 2016)

3.1.3. *Cyclamen pseudibericum* Hildebrand

Türkiye'ye endemik ve tehlike altında olan *C. pseudibericum* türü, Doğu Akdeniz bölgesinde özellikle Hatay, Adana ve Kahramanmaraş civarında ve Niğde Zamantı nehri kıyılarında yayılış göstermektedir. Toros ve Amanos dağlarında 500 rakımdan 1500 rakıma kadar olan bölgelerde yayılışına rastlamak mümkündür. Çam ağaçlarının meydana getirdiği ormanlıklar, çalılıklar ve kayalıkların arasında çürümüş yaprakların oluşturduğu humusça zengin topraklar, türün doğal yaşam alanını oluşturmaktadır. Mart ile Mayıs ayları arasında çiçeklenen türün taç yaprakları koyu veya soluk pembe, pembemsi mor veya koyu kırmızı olmakla birlikte nadiren beyaz çiçeklere de rastlanılmaktadır. Korollaların tabanında mora yakın koyu pembe lekeler bulunmaktadır. Çapı 7 cm'ye karar ulaşabilen türün yumruları gençken pürüzsüz bir yüzeye sahipken, bu doku yaşlandıkça bozularak girintili çıkıntılı bir hal almaktadır. Türü, diğer siklamen türlerinden ayıran en belirgin özellik, çiçeklerinin kokulu olmasıdır. Türün kromozom sayısı $2n= 30$ olarak kayıtlarda yer almaktadır.



Şekil 3.5. Doğal yayılış gösteren *C. pseudibericum* türü

3.1.4. *Cyclamen cilicium* Boissier & Heldreich

Ülkemizde endemik olan bu tür, Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği tarafından yayımlanan Kırmızı Kitap'ta (Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Listesi) az tehlike altında olan türler kategorisinde yer almaktadır. Güneyde Toros dağları boyunca, Adana ve Mersin'den Konya, Antalya ve Isparta illerine kadar olan bölgede yetişmektedir. Toros dağlarında 700 ila 2000 rakımlar arasında yayılım gösteren türe, karaçam ve göknar ağaçlarının oluşturduğu ormanlık alanlarla kayalık ve çalılık bölgelerdeki gölge veya yarı gölge alanlar da rastlamak mümkündür. Eylül ayında başlayan çiçeklenme, yükselti ve enleme bağlı olarak kasım ayının sonlarına kadar devam edebilmektedir. Genelde türe ait çiçekler beyaz ve açık pembe olurken benekli yapıda ve hafif kokulu çiçeklere de rastlanılabilmektedir. Yaprakların üst kısmı gümüşü desenli yeşil renkliyen, alt kısmı koyu kırmızı veya mor renktedir. Pürüzsüz yapıda olan yumrular genellikle basık küre veya küre şeklinde olup, 7.3 cm çapa ulaşabilmektedir. Türün kromozom sayısı $2n=30$ 'dur.

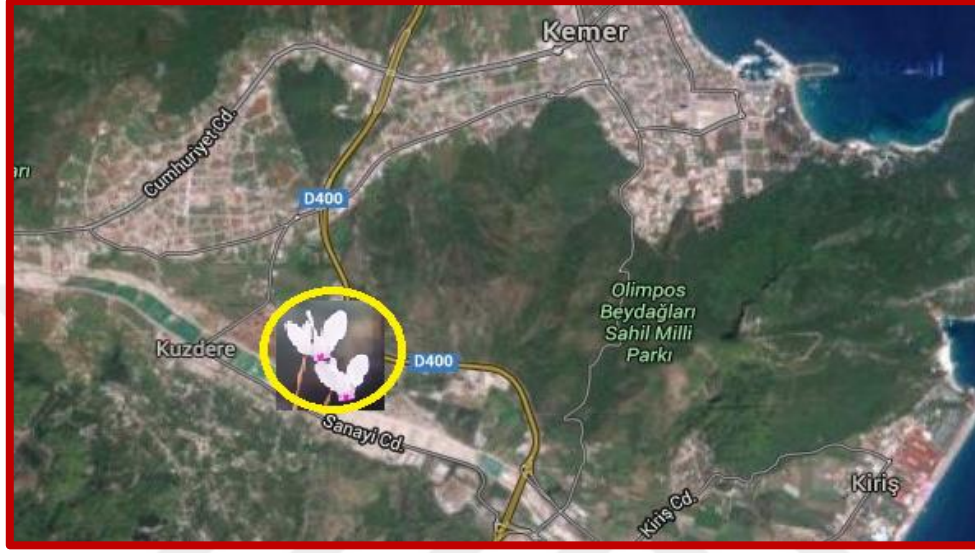


Şekil 3.6. Doğal yayılış gösteren *C. cilicium* türü (Mendi ve Çürük, 2016)

3.1.5. *Cyclamen graecum* Link

Oldukça geniş bir yayılış alanına sahip olan *C. graecum* türü, Akdeniz havzasında Kıbrıs'ın kuzey kısımlarından başlayarak Rodos, Girit, Ege adaları ve Mora yarımadasında doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'de yalnızca Antalya ilinde yayılış göstermekle birlikte, özellikle Olimpos-Beydağları Milli Parkı, Kemer ve Phaselis antik kentinde oldukça yoğun popülasyonların olduğu bilinmektedir. Deniz seviyesinden başlayıp 600 rakıma kadar olan yükseltilerde, çam ağaçları ile kaplı ormanlık alanda, çürümüş çam yaprakları ile kaplı topraklarda, gölge ve yarı gölge alanlarda yetişmektedir. Beyaz ve hafif pembeden, mor tonlarında koyu pembeye kadar değişen renk tonlarına rastlanabilen çiçekleri eylül ayında, yapraklardan hemen önce açmaya başlar ve çiçeklenme kasım ayına kadar sürer. Çiçekleri oldukça büyük ve kuvvetli sap yapısına sahip olabilmektedir. Yaprak üzerinde ağ şeklinde gri desenler veya gri renkli beneklenmeler görülmektedir. Küre şeklinde olan yumrunun çapı, 3 ila 6 cm arasındadır. *C. graecum* çeşidinin kromozom sayısı

$2n=84$ 'tür. Bu tür, tez çalışması kapsamında, Olimpos Beydağları Sahil Milli Parkı ve Phaselis Antik Kenti bölgesinden toplanılmıştır.



Şekil 3.7. *C. graecum* türünün toplandığı yerler

3.2. Metot

Tez çalışması kapsamında ilk yıl kullanılan bitkisel materyallerin bakımı, kurulan *in vitro* denemeler, aklimatizasyon çalışmaları ve dış koşullara alıştıırılan bitkilerin kültürel bakım işlemleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü süs bitkileri serasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci yılında kullanılan bitkisel materyaller, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Islah ve Genetik Bölümü'ne getirilerek, denemeler Alata Bahçe Kültürleri AEM İleri Teknoloji Laboratuvarında kurulmuş ve aklimatizasyon çalışmaları için aynı laboratuvara bağlı iklimlendirmeli alıştıırma serası kullanılmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon Denemeleri

In vitro çalışmaların en önemli basamağını sterilizasyon aşaması oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalara ilişkin yayınlarda çok fazla

konu edilmese de, pek çok çalışmanın başlangıç aşamasında patojenler nedeni ile büyük kayıplar yaşanmaktadır. Bu nedenle sterilizasyon prosedürünün optimizasyonu tez çalışmasının ilk adımını oluşturmuştur. Yumru dokularının eksplant kaynağı olarak kullanılması nedeni ile karşılaşılabilecek muhtemel patojenlere karşı bir sterilizasyon ön denemesi kurulmuştur. Bu denemede yalnızca *C. persicum* türüne ait yumrular kullanılmış olup, her değişken için farklı bitkilere ait yumrular kullanılmıştır. Her uygulama için 8 petri kullanılmış, her petride 4 eksplant yer almıştır. Ortam olarak, 30 g L⁻¹ sukroz ilave edilmiş hormonsuz ½ MS ortamı, kullanılmıştır. Denemede kuru yakma ile birlikte tek ve iki aşamada farklı dozlarda sodyum hipoklorit kombinasyonları uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Sterilizasyon denemesine ait değişkenler

Deneme no	NaClO (Domestos®)	% 98 Alkol ile 1 dk. Kuru yakma	Kabuk soyma	NaClO (Domestos®)	3 kez Steril saf su ile Durulama
1	15 dk. % 20			20 dk. % 20	
2	15 dk. % 50	20 dk. % 20			
3	Yok	20 dk. % 20			
4	Yok	20 dk. % 50			

Deneme sonucunda yeterli oranda steril eksplant elde edilemediği için farklı değişkenlerle ikinci bir sterilizasyon denemesi kurulmuştur. Denemeye öncelikle anti bakteriyel sabun ile fırçalanarak temizlenme ve akan musluk suyu altında bekletme işlemleri ile başlanmıştır. Bir öncekinden farklı olarak kabuk soyma işlemi sterilizasyon ajanlarının uygulanmasından önce yapılmıştır. Denemede, *C. persicum* türüne ait 5 farklı bitki (yumru) kullanılmış olup, büyük olan yumrular, 3 parçaya ayrılarak kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

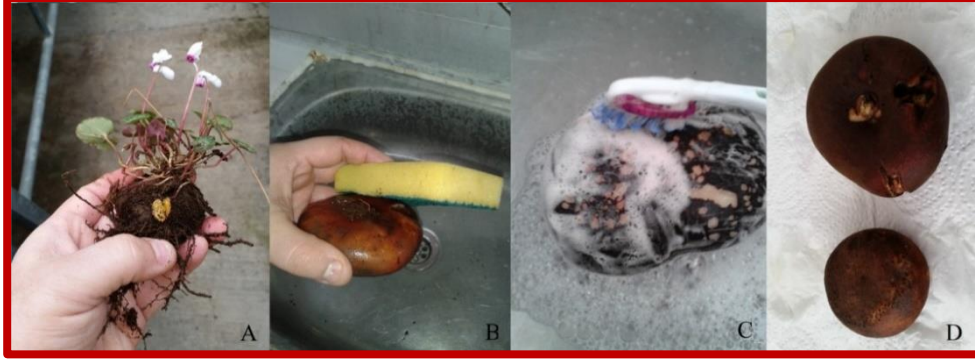
Çizelge 3.2. İkinci sterilizasyon denemesine ait değişkenler

		Kabuk soyma	Yumru no	HgCl ₂ (%)		Kuru yakma	NaOCl (%) (Domestos®)		Steril saf su ile durulama
3 kez Aktivex® sabun ile yıkama	Akan musluk suyu altında 20 dakika bekletme	Kabuk soyma	1	0.1	20 dk.	Kuru yakma	30	20 dk.	Steril saf su ile durulama
			2A	0.1	20 dk.		30	20 dk.	
			2B	0.2	20 dk.		30	20 dk.	
			2C	0.1	30 dk.		30	20 dk.	
			3A	0.1	30 dk.		20	20 dk.	
			3B	0.1	30 dk.		40	20 dk.	
			3C	0.1	30 dk.		60	20 dk.	
			4	0.1	30 dk.		30	30 dk.	
			5	0.1	30 dk.		50	30 dk.	

Her uygulama için 13 ila 18 arasında petri kullanılmış ve her petride 5 eksplant yer almıştır. Altı hafta sonunda alınan gözlemlerde, enfeksiyon gelişimi ve canlı eksplant sayıları yüzde değerlendirmeye alınmıştır. Her iki denemede elde edilmiş olan yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulandıktan sonra verilerin analizi JMP (sürüm 5.01) paket programı ile yapılmıştır. Ortalamaların önem seviyeleri, LSD (P<0,01) testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Yumru Eksplantlarının Sterilizasyonu

İlk olarak serada bulunan yumrular, yaprak, kök ve büyük toprak parçalarından uzaklaştırılmıştır. Sonraki aşamada laboratuvara getirilen yumrular, akan musluk suyu altında bulaşık süngeri ile toprak artıklarından tamamen temizlenmiştir. Anti-bakteriyel (Activex®) sabun ile 3 kez fırçalanarak temizlenen yumrular, beherlere konularak akan musluk suyu altında 20 ila 30 dakika bekletilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. A) Çiçeklenme döneminde alınan yumru, B) Bulaşık süngeri ile toprak parçalarının uzaklaştırılması, C) Antibakteriyel sabun ile fırçalayarak temizleme, D) Temizlenmiş yumruların genel görünümü.

Sterilizasyon aşamasında, ön denemelerde en iyi sonucu vermiş olan ikinci sterilizasyon denemesine ait 4 no'lu uygulama kullanılmıştır. Buna göre yumrular, akan musluk suyu altında bekletildikten sonra kabukları soyularak sterilizasyon ajanlarının kullanımına geçilmiştir. İlk olarak çeker ocak içerisinde 30 dakika süreyle % 0.1'lik $HgCl_2$ çözeltisinde bekletilen yumrular, üçer kez steril saf su ile durulandıktan sonra cıva çözeltisinin uygulandığı magentaların içerisinde, ağızları kapalı bir şekilde steril kabine alınmışlardır. Steril kabin içerisinde % 98'lik alkol dökülerek kuru yakma işlemi gerçekleştirilmiş ve % 70'lik alkol ile alev beslenerek yakma işleminin 30 saniye sürmesi sağlanmıştır. Ardından steril magentalara alınan yumrular burada 30 dakika süreyle % 30'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilmişlerdir. Son olarak üçer kez steril saf su ile durulanan yumrular, kültüre alma için dilimlenmeye hazır hale gelmişlerdir.



Şekil 3.9. Sterilizasyon işleminin uygulanması. A) Çeker ocakta cıva klorür uygulanması. B) Steril kabin içerisinde kuru yakma işlemi. C) Sodyum hipoklorit uygulaması. D) Dilimlenmeye hazır yumrular

3.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması

Yumur parçalarının *in vitro* rejenerasyon denemeleri için temel besi ortamı olarak $\frac{1}{2}$ MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bunun için hazır toz halde temin edilen MS besi ortamı (Sigma&Aldrich M5524 Murashige and Skoog Basal Salt Mixture) 2.15 g tartılarak 1 litre saf suda çözülmüştür. Besi ortamına otoklav öncesi vitamin olarak 34.51 mg L⁻¹ demir EDTA, 250 mg L⁻¹ neo-peptone, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2 mg L⁻¹ glisin, 0.1 mg L⁻¹ nikotinik asit, 0.5 mg L⁻¹ thiamine HCl ve 0.5 mg L⁻¹ pyridoxine ilave edilmiştir. Karbon kaynağı olarak 30 g L⁻¹ sakkaroz ile 2 g L⁻¹ dozlarında glikoz ilave edilmiştir.

Çizelge 3.3. *In vitro* rejenerasyon denemelerinde kullanılan MS ortamı ve içeriği

Makro elementler (1/2 MS)	(mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ x 2H ₂ O	220
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
Mikro elementler (1/2 MS)	(mg L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	3.1
MnSO ₄ x1H ₂ O	8.45
ZnSO ₄ x7H ₂ O	5.3
KI	0.415
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.0125
Diğer Bileşikler	(mg L ⁻¹)
Fe EDTA	34.51
Peptone	250
myo-Inositol	100
Glisin	2
Nikotinik asit	0.1
Thiamine HCl	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Karbonhidratlar	(g L ⁻¹)
Sakkaroz	30
D(+)-glucose monohydrate	2
Jel yapıcı ve fenol tutucular	(g L ⁻¹)
Gelrite	3
Polivinilpolipirolidon	1

Temel besi ortamına ilave olarak somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek için 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg L⁻¹ 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ile 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹ izopentiladenin (2iP) kombinasyonları, kontrol olarak BBD ilave edilmemiş besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Son olarak fenolik maddelerin neden olduğu kararmaları önlemek için ortamlara 1 g L⁻¹ PVP (Polivinilpolipirrolidon) ilave edilmiştir. Ortam pH'sı 1 N sodyum hidroksit (NaOH) ya da 1 N hidroklorik asit (HCl) kullanılarak 5.6'ya ayarlandıktan sonra 3 g L⁻¹ gelrite ilave edilmiş ve ortam 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Ortamlar soğumadan önce steril kabin içerisinde 9 cm çapındaki petri kaplarına, her petride yaklaşık 25 ml ortam olacak şekilde dökülmüştür.

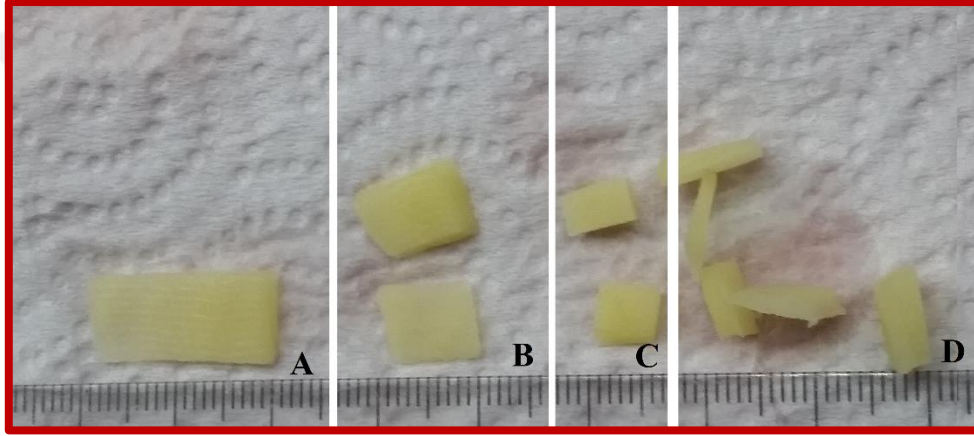
Çizelge 3.4. Somatik embriyo elde etmek için kullanılan BBD kombinasyonları

BBD	2,4-D mg L ⁻¹	2 iP mg L ⁻¹
Kontrol	0	0
1	0.5	0.1
2	0.5	0.3
3	0.5	0.5
4	0.5	0.8
5	1.0	0.1
6	1.0	0.3
7	1.0	0.5
8	1.0	0.8
9	1.5	0.1
10	1.5	0.3
11	1.5	0.5
12	1.5	0.8
13	2.0	0.1
14	2.0	0.3
15	2.0	0.5
16	2.0	0.8

3.2.4. Uygun Eksplant Boyutunun Belirlenmesi

Denemelerde genotipler arası farklılığı en aza indirmek için bir bitkiye ait yumrudan mümkün olduğunca en fazla sayıda eksplant elde edilerek tüm dozların tek

bir bitki ile kurulmasına gayret edilmiştir. Bunun için yumrular, mümkün olduğunca küçük kesilmiştir. Özellikle ince hücre kesiti (TLC; Thin Cell Layer) gibi çalışmalarda, eksplant boyutunun rejenerasyonu etkilediği bilindiği için çalışmaya öncelikle uygun eksplant boyutu belirlenerek başlanmıştır. Bunun için, 1, 2 ve 3 mm kalınlıkta ve 0.5 x 0.5, 1 x 0.5, 1 x 1 ve 2 x 1 cm olmak üzere farklı boyutlarda kesilen *C. persicum* türüne ait eksplantlar kültüre alınmış, kallus oluşturma yetenekleri incelenmiştir.



Şekil 3.10. Farklı boyutlarda kesilmiş eksplantların genel görünümü A) 2 cm X 1 cm eninde, B) 1 cm X 1 cm eninde, C) 0.5 cm X 0.5 cm eninde, D) 1 mm, 2 mm ve 3 mm eninde kesilmiş eksplantlar

3.2.5. Yumruların Farklı Dönemlerde Kültüre Alınması

Çalışmada, yumruların çiçeklenme ve dinlenme dönemi arasındaki somatik embriyo oluşturma yetenekleri ve rejenerasyon oranlarını karşılaştırmak için bitkiler, hem çiçeklenme dönemleri içerisinde hem de yazın dinlenmeye girdikleri dönemde *in vitro* koşullarda kültüre alınmışlardır. Türlerine göre denemelerin kurulduğu dönemler, Çizelge 3.5’de yer almaktadır. *C. pseudibericum* türünün çiçeklenme zamanını kayıtlarda, mart-mayıs ayları olarak yer almasına karşın, tezin yürütüldüğü zaman dilimi içerisinde sera koşulları ve kültürel işlemler nedeniyle bu zaman ocak ayının ortalarına kadar gerilemiştir.

Çizelge 3.5. Türlerin çiçeklenme dönemlerine göre *in vitro* kültüre alınma zamanları

Tür \ Dönem	Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi
<i>C. persicum</i>	Haziran - Temmuz	Ocak - Nisan
<i>C. pseudibericum</i>	Haziran - Temmuz	Ocak - Nisan
<i>C. coum</i>	Haziran - Temmuz	Ocak - Nisan
<i>C. cilicium</i>	Haziran - Temmuz	Eylül - Kasım
<i>C. graecum</i>	Haziran - Temmuz	Eylül - Kasım

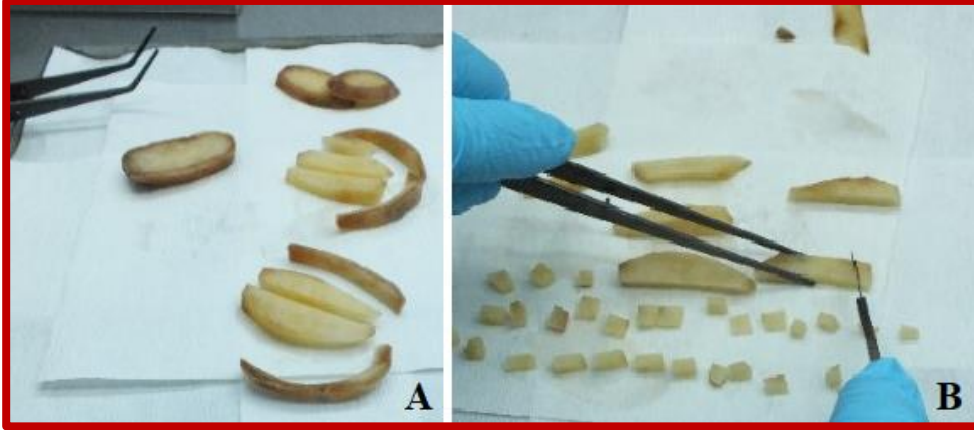
Kurulan denemeler sonucunda eksplantların kallus oluşturma oranları, somatik embriyoya dönüşümleri, kök veya sürgün geliştiren eksplant oranları ile bitkiciğe dönüşümleri gözlenerek yüzde değer olarak rapor edilmiştir. Elde edilmiş olan yüzde değerlere açı transformasyonu uygulandıktan sonra verilerin analizi, JMP (sürüm 5.01) paket programı ile yapılarak ortalamaların önem seviyeleri LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.5.1. *C. persicum* ve *C. pseudibericum* Türleri İlk Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri

C. persicum ve *C. pseudibericum* türlerine ait birinci yıl çiçeklenme dönemi denemesi nisan ayında kurulmuştur. Deneme için gerekli sayıda eksplant elde edebilmek amacı ile her türde birden fazla yumru (genotip) kullanılmıştır (Şekil 3.11). Sterilizasyon işleminin ardından yaklaşık 2 mm kalınlığında ve 1 cm² olacak şekilde dilimlenen yumrular, içerisinde yaklaşık 25 ml besi ortamı olan petri kaplarına yerleştirilmiştir. Denemede kontrolün yanı sıra 16 farklı BBD konsantrasyonu (2,4-D; 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg L⁻¹ ve 2iP; 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹ kombinasyonları) kullanılmıştır. Deneme, her petride 5 eksplant olacak şekilde 5 tekerrürlü (her petri bir tekerrür) olacak şekilde kurulmuştur. Dikim öncesi yumruların sterilizasyon işleminden zarar gören dış kısımları ince bir tabaka halinde kesilerek uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. Denemede kullanılan yumruların genel görünümü



Şekil 3.12. Yumruların *in vitro* kültür için hazırlanması A) Sterilizasyon işleminde zarar gören dış yüzeyin temizlenmesi B) Yumruların dilimlenerek eksplantların elde edilmesi

3.2.5.2. İlk Yıl Dinlenme Dönemi Denemeleri

Yumruların dinlenme dönemi denemesi için Mayıs ayı içerisinde sulama işlemine ara verilerek yaprak ve çiçek gibi toprak üstü aksamalarının tamamen kuruması beklenmiştir. Denemede, *C. persicum*, *C. cilicium*, *C. pseudibericum* ve *C. graecum* türlerine ait yumrular kullanılmıştır. Bahar döneminde kurulmuş olan çiçeklenme denemesinde yoğun miktarda kök ve sürgün gelişimi (organogenesis) gözlenmiştir. Bu nedenle yumrular alt ve üst olmak üzere iki ayrı kısma bölünerek bu bölgeler ayrı ayrı kültüre alınmıştır. Bu şekilde köklerin geliştiği yumrunun alt

kısmı ile toprak üstü organların geliştiği üst kısmı arasındaki (kök ve sürgün) rejenerasyon farklılığının gözlenmesi hedeflenmiştir.



Şekil 3.13. *C. cilicium* türüne ait 2 no'lu genotip A) Kabuk soyma işleminde kesilerek atılan üst bölgeye ait kısım, B) yumrunun "üst bölge" olarak kültüre alınan kısmı, C) yumrunun "alt bölge" olarak kültüre alınan kısmı, D) kabuk soyma işleminde kesilerek atılan alt bölgeye ait kısım

3.2.5.3. *C. graecum* ve *C. cilicium* Türleri İlk Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri

Güz döneminde çiçeklenmeye başlayan *C. graecum* ve *C. cilicium* türlerinin bir önceki yılda çiçeklenme dönemi yakalanamadığı için kasım ayı içerisinde bu türler için ilk kez çiçeklenme dönemi denemeleri kurulmuştur. Çalışmanın bu kısmında deneme değişkenlerine 2,4-D ve 2 iP'nin yanı sıra İndol-3-bütirik asit (IBA) ve Benzil adenin (BA) ilave edilmiştir. BA, IBA'nın 3 katı (3/1 oranında) olacak şekilde, sırası ile IBA ve BA; 0.1 + 0.3, 0.3 + 0.9, 0.5 + 1.5 ve 0.8 + 2.4 mg L⁻¹ dozlarında besi ortamlarına ilave edilmiştir.

3.2.5.4. *C. coum*, *C. persicum* ve *C. pseudibericum* Türleri İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri

2017 Ocak ayında, *C. persicum*, *C. coum* ve *C. pseudibericum* türleri için olası yıl farklılığını tespit etmeye yönelik olarak ikinci kez çiçeklenme dönemi denemeleri kurulmuştur. Denemelerde 2,4-D ve 2 iP kullanımına ilave olarak, 0.1 + 0.3, 0.3 + 0.9, 0.5 + 1.5 ve 0.8 + 2.4 mg L⁻¹ dozlarında sırası ile IBA ve BAP kullanımına devam edilmiştir. *C. coum* türü çalışmaya sonradan (TAGEM kararı ile) dâhil edildiği için bu deneme *C. coum* türü için kurulan ilk çiçeklenme dönemi denemesi olmuştur. İlerleyen dönemde kurulan ayrı bir deneme ile bu tür için de iki yıllık veri elde edilmiştir.

3.2.5.5. İkinci Yıl Dinlenme Dönemi Denemeleri

Toplam 5 tür ile kurulan denemede *C. persicum*, *C. cilicium*, *C. pseudibericum*, *C. graecum* ve *C. coum* türlerine ait yumrular kullanılmıştır. Bir öncekiyle benzer şekilde mayıs ayı içerisinde sulama işlemine ara verilerek, bitkiler tamamen dinlenmeye girdikten sonra yumrular *in vitro* kültüre alınmıştır. Bitki büyüme düzenleyici olarak, 2,4-D ve 2iP'nin yanında IBA ve BA kullanılmaya devam edilmiştir. *C. coum* türü çalışmaya sonradan (TAGEM kararı ile) dâhil edildiği için bu deneme *C. coum* türü için kurulan ilk dinlenme dönemi denemesi olmuştur. İlerleyen dönemde kurulan ayrı bir deneme ile bu tür için de iki yıllık veri elde edilmesi sağlanmıştır.

3.2.5.6. *C. graecum* ve *C. cilicium* Türleri İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Denemeleri

Tez çalışmasına başlandığı dönemde, *C. graecum* ve *C. cilicium* türlerinin çiçeklenmeleri geçtiği için bu türlerin ikinci kez çiçeklenme dönemi denemeleri ekim ayı içerisinde kurulmuştur. Ayrıca ocak ayı içerisinde, *C. coum* türü için çiçeklenme denemesi ikinci kez kurularak tekrar edilmiştir. IBA ve BAP

kullanımları ile elde edilmek istenen rejenerasyon sağlanamadığı için çalışmanın bu kısmında yalnızca 2,4-D ve 2 iP kullanılmıştır.

3.2.6. Köklendirme Denemeleri

Çalışma süresince elde edilen köksüz sürgünlerin ve kök gelişimleri zayıf olan bitkiciklerin dış ortama aktarılmadan önce yeterli miktarda kök oluşumlarını sağlamak için bitkiciklerin bir kısmı ile köklendirme denemesi kurulmuştur. Bunun için alt kültür aşamasında, 1, 2 ve 3 mg L⁻¹ IBA içeren ½ MS ortamı kullanılmış ve kök gelişimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, aklimatizasyon işleminden önce gerçekleştirilen son alt kültür aşamasında bitkiler IBA içeren besi ortamına alınmışlardır.

3.2.7. Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu

Çalışmada, organogenesis ile elde edilmiş olan sürgün yapılarının çoğunda ilave BBD kullanılmadan kök yapıları gelişmiştir. Kök yapısı bulunmayan yaprak ve sürgünler ise, köklendirme ortamında yeterli kök oluşumları sağlandıktan sonra dış ortama alıştırılmıştır. Embriyogenesis ile elde edilmiş olan somatik embriyo yapıları ise çimlenip kök ve yumru yapıları oluşturulduktan sonra dış koşula alıştırılmış, köklendirme için besi ortamına ayrıca BBD ilavesi gerekmemiştir. *C. persicum* türüne ait somatik embriyo yapıları, kallus ve embriyoların oluştuğu BBD dozunda alt kültürler esnasında çimlenmiştir. Diğer türlere ait somatik embriyoların çimlenmesi için BBD içermeyen besi ortamı kullanılmıştır.

Bitkicikler öncelikle magentalara aktarılmış, yeterli miktarda olgunluğa erişmeleri beklenmiştir. Yeterli kök gelişimlerinin ardından bitkiler, besi ortamlarından çıkarılarak musluk suyu ile yıkanmış ve besi yerinden tamamen arındırılmıştır. Son olarak bitkiler, % 0.2'lik Captan içeren fungusit çözeltisinde birkaç saniye bekletildikten sonra dikim işlemi gerçekleştirilmiştir. Alıştırma işlemi için viyol ve saklama kapları, kullanılmadan önce % 5 oranında hazırlanmış NaOCl (ticari Domestos®) çözeltisi ile yıkanarak temizlenmiştir. Gerçekleştirilen ilk

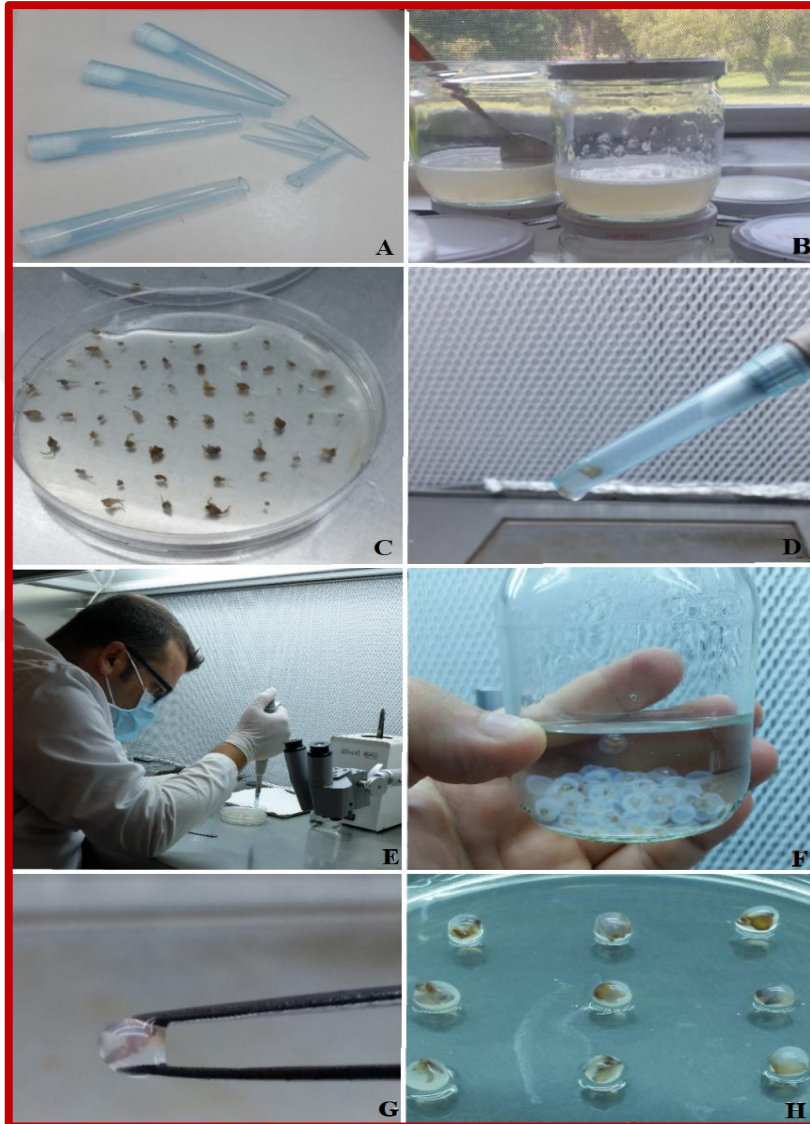
aklimatizasyon işleminde bitkicikler, otoklavda steril edilmiş perlit-torf (1:1) karışımı içeren viyollere dikilerek kültürel bakım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ancak hızla gelişen fungus miselleri bitkiciklerin kısa sürede ölümüne neden olmuştur. Bu nedenle ilerleyen aklimatizasyon işlemleri için kullanılan perlit-torf karışımı steril edilmeden, otoklavda 90 °C sıcaklıkta 1.5 saat tutulduktan sonra kullanılmıştır. Dikim işleminden sonra viyoller kapakları yarı açık şekilde bulunan saklama kaplarına yerleştirilerek bir hafta süreyle iklim odasında tutulmaya devam edilmiştir. Bir hafta sonunda bitkiler, üzerlerinde % 40 gölge tülü bulunan alıştırma serasına alınmıştır.

3.2.8. Sentetik Tohum Denemeleri

C. coum, *C. cilicium* ve *C. persicum* türlerinde yumru eksplantlarından elde edilen somatik embriyolar kaplama işlemi kullanılmıştır. *C. graecum* türünde ise, SE yapıları elde edilemediği için, denemeler yumru eksplantından elde edilen sürgün uçları kaplanılarak kurulmuştur. *C. pseudibericum* türünde ise elde edilen kallus yapıları organojenik veya embriyojenik yapılara dönüşmediği bu denemeye dâhil edilememiştir.

Denemede kaplama işlemi için bitkiler üzerine herhangi bir toksik özelliği olmayan, toz halde bulunan sodyum aljinat ($C_6H_7NaO_6$) bileşiği kullanılmıştır. Bunun için önceden 100 ml olarak hazırlanmış olan ortamlara, 1,5 g (%1,5) ve 3 g (%3) olmak üzere iki farklı oranda sodyum aljinat ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcıda yaklaşık 15 dakika tamamen eritildikten sonra 121 °C'de 15 dakika bekletilerek steril hale getirilmiştir. Denemelerde somatik embriyo ve sürgün yapıları için farklı ortam içeren kaplama materyalleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Sodyum aljinat bileşiminde bulunan sodyum molekülü ile yer değiştirerek kaplama işleminin gerçekleşmesini sağlamak için, $14,702 \text{ g L}^{-1}$ oranında $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi kullanılmıştır. Kaplama işleminde kullanılan MS ortamı hazırlanırken, ayrı ayrı hazırlanmış olan makro ve mikro stok çözeltileri kullanılmıştır. Sodyum aljinat ile kaplama işleminden önce jelleşme

gerçekleşmemesi için MS stok çözeltilerine kalsiyum ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ilave edilmemiştir.



Şekil 3.14. A) Kesik pipet uçlarının görünümü B) Sodyum aljinat çözeltisi C) Aljinat çözeltisinde bekletilen eksplantlar D) Tek tek pipetle çekilen aljinat çözeltisi ve eksplantlar E) Eksplantların kalsiyum çözeltisine alınması F) Kaplama işlemi sırasında eksplantların görünümü G) Kaplanmış bir somatik embriyo H) Sentetik tohumların ekimi

Çizelge 3.6. Kaplama materyalinde kullanılan bileşenler

	Somatik Embriyo	Sürgün Ucu
Kontrol	Kaplama yapılmadı	Kaplama yapılmadı
1	Saf su	Saf su
2	½ MS (Ca içermeyen)	½ MS (Ca içermeyen)
3	2 mg L ⁻¹ GA ₃ + 1 mg L ⁻¹ BA + 1 g L ⁻¹ proline + 0.1 mg L ⁻¹ spermin	0.1 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ BA
4	4 mg L ⁻¹ GA ₃ + 2 mg L ⁻¹ BA + 2 g L ⁻¹ proline 0.2 mg L ⁻¹ spermin	0.1 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ BA

Kaplama işleminde kullanılan pipet uçları, somatik embriyo ve sürgün uçları girebilecek şekilde kesilmiş ve ardından otoklavda steril edilmiştir. Denemelerde kullanılan somatik embriyo ve sürgün uçları öncelikle, ucu kesilmiş 1000 µl'lik pipet ucundan geçebilecek büyüklükte olacak şekilde birbirlerinden ayrılmışlardır. Eksplantlar, MS ortamında bulunan kalsiyumdan arındırılmak için steril saf su ile durulanmıştır. Ardından, sodyum aljinat çözeltisine konulan eksplantlar, 15 dakika bekletilerek çözelti ile iyice ıslanmaları sağlanmıştır. Sodyum aljinat çözeltisinde ıslatmanın ardından eksplantlar çözelti ile birlikte tek tek steril pipet ucu ile (50 - 75 µl) çekilerek çalkalanmakta olan kalsiyum çözeltisine dikkatli bir şekilde damlatılmışlardır. Kaplama işleminin tamamlanması için eksplantlar, 15 - 20 dakika kalsiyum çözeltisinin içerisinde bekletilmişlerdir. Ardından otoklavda steril edilmiş metal süzgeç ile süzülerek kalsiyum çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Son olarak steril saf su ile durulanan sentetik tohumlar, her petride (9mm) 10 örnek olacak şekilde ½ MS ortamında kültüre alınmışlardır. Deneme her değişken için 3 petri (tekerrür) kullanılarak kurulmuştur (Şekil 3.14).



4. BULGULAR

4.1. Sterilizasyon Denemelerine Ait Bulgular

Gerçekleştirilen ilk sterilizasyon denemesinde, kuru yakma işleminden önce ve sonra sterilizasyon ajanı olarak yalnızca sodyum hipoklorit kullanılmış olup, denmeye ilişkin elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.1. Birinci sterilizasyon denemesine ait sonuçlar

Uygulama	NaOCl (Domestos®)	Kuru yakma ve kabuk soyma	Sodyum hipoklorit	Enfeksiyon %	Canlı bitki %
1	15 dk. %20		20 dk. %20	53b (46)	46a (43)
2	15 dk. %50		20 dk. %20	50b (45)	50a (45)
3	Yok		20 dk. %20	81a (71)	21b (24)
4	Yok		20 dk. %50	40b (39)	46a (41)

***LSD_{Enfeksiyon} = 14.29 (p<0.001) *LSD_{Canlı Bitki} = 15.43 (p<0.05)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklı değerleri ifade etmektedir.

Buna göre en düşük enfeksiyon oranı (% 40), kuru yakma ve kabukların soyulmasının ardından 20 dakika % 50'lik NaOCl çözeltisinde bekletme ile elde edilmiştir. Ancak, bu uygulamada eksplantların büyük kısmında kararmalar meydana gelmiş ve canlılık oranı düşmüştür. Diğer uygulamalarda da benzer şekilde en yüksek canlılık oranı, ancak % 50'lere kadar çıkabilmiştir. Bu nedenle sterilizasyon prosedürünün değiştirilmesine karar verilerek yeni bir deneme kurumuştur.

Benzer şekilde anti bakteriyel sabun ile yıkama ve musluk suyunda bekletme işlemleri ile başlayan bu denemede, kabuk soyma işlemi sterilizasyon ajanları uygulanmadan önce gerçekleştirilmiştir. Denemede en düşük enfeksiyon oranı, % 26 ile 4 no'lu uygulamadan (% 0.1'lik cıva solüsyonunda, 30 dakika bekletme, kuru yakma ve son olarak % 30'luk ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde 30 dakika

bekletme) elde edilmiş (Çizelge 4.2) ve takip eden denemeler bu sterilizasyon prosedürü uygulanarak kurulmuştur.

Çizelge 4.2. İkinci sterilizasyon denemesine ait sonuçlar

Uygulama no	3 kez Aktivex® sabun ile fırçalayarak yıkama	Akan musluk suyu altında 20 dakika bekletme	HgCl ₂ (Cıva klorür)		Kuru yakma	Sodyum hipoklorit		Enfeksiyon	Canlılık
			Doz %	Süre (dk.)		Doz %	Süre (dk.)		
1	Kabuk soyma	Kuru yakma	0,1	20	30	20	34d (35)	66a (55)	
2A			0,1	20	30	20	52b (46)	48c (44)	
2B			0,2	20	30	20	36cd (36)	64ab (54)	
2C			0,1	30	30	20	50bc (45)	50bc (45)	
3A			0,1	30	20	20	84a (72)	16d (18)	
3B			0,1	30	40	20	40bcd (39)	60abc (51)	
3C			0,1	30	60	20	30d (33)	70a (57)	
4			0,1	30	30	30	26d (30)	74a (60)	
5			0,1	30	50	30	40bcd (39)	60abc (51)	

***LSD Enfeksiyon = 8.96 (p<0.001) ***LSD Canlılık= 8.96 (p<0.001)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklı değerleri ifade etmektedir.

Birçok doku kültürü çalışmasında karşılaşılan en büyük problemlerden biri, kullanılan eksplantların sterilizasyonu olup *in vitro* çalışmaların en önemli aşamasını oluşturur (Mayer, 1956; Stichel, 1959). Çalışma boyunca kullanılmasına karar verilen sterilizasyon prosedürü, şu haliyle her ne kadar yeterli görülse de, çalışma süresince kurulan bazı denemelerde bir genotipe ait tüm eksplantların kaybına neden olacak ölçüde geniş çaplı fungus veya bakteri enfeksiyonları ile karşılaşılmıştır. Bu nedenle takip eden denemelerde, enfeksiyon oranları yalnızca yüzde oranlar kaydedilmiştir. Ancak yüzde oranlar bile dönemler veya genotipler arası farklılığı tespit etmek için yeterli olmuştur. Sterilizasyon işleminin başarısının anaç bitkinin yetiştiği ortama ve eksplantın alındığı organa göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (Doğan-Kalyoncu, 2007). Tez çalışmasında *C. graecum* ve *C. cilicium* türleri ile kurulmuş olan bazı denemelerde yoğun olarak akar zararlısı ile karşılaşılmıştır (Şekil

4.1). Siklamen akarı (Cyclamen mite) olarak da bilinen *Phytonemus pallidus* türünün, Afrika menekşesi ve siklamen gibi süs bitkilerinde zarara yol açtığı ve siklamen yumruları ile taşınabildiği bilinmektedir. Bunun yanında doku kültürü uygulamalarında karşılaşılan akar zararlısının daha sonradan kültür ortamına girebildiği de bilinmektedir (Anonim, 2019). Uygulanan kültürel işlemlerle bu enfeksiyon kaynağının kısmen önüne geçilebilmesi, eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkilerin temin edildiği bölge veya yetiştirme koşullarının enfeksiyon oranı üzerine olan etkisini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.1. *C. graecum* türünde *in vitro* kültür koşullarında karşılaşılan akar zararlısı A) Besi ortamı üzerinde akar zararlısının oluşturduğu izler, B) Akar zararlısının gezdiği bölgelerde gelişmeye başlayan bakteriler, C) ve D) akar zararlısının binoküler altında görünümü

Geier (1977) sterilizasyon için %3 NaOCl ve % 0.03 cıva klorür kullanarak gerçekleştirdiği sterilizasyon işlemi ile yaprak ve çiçek parçalarında başarı elde ettiğini bildirirken, aynı prosedürün uygulandığı siklamen yumrularında % 65 ile % 97 arasında değişen oranlarda enfeksiyon gözlemlendiğini bildirmiştir. Bu nedenle aynı laboratuvarında siklamen türleri ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda (Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016; Sevindik, 2018) toprak üstü organlarda başarı ile uygulanan sterilizasyon prosedürleri ile yumru eksplantının kullanıldığı tez çalışmasında başarı sağlanamamıştır. Stichel (1959) ayrıca, *in vitro* kültürün kurulduğu yani eksplantın alındığı dönemin de sterilizasyon başarısını etkilediğini, haziran ayında alınan

yumrular ile kurulan denemelerde, kasım - ocak ayındakilere nazaran daha az enfeksiyon problemi ile karşılaşıldığını rapor etmiştir. Çalışma süresince, dinlenme döneminde kurulan denemelerde karşılaşılan enfeksiyonlar, çiçeklenme dönemine nazaran daha az sorun teşkil etmiştir. Özellikle ikinci yıl çiçeklenme dönemi denemelerinde, fungus etmenlerinin neden olduğu kayıplar denemelerin 3 kez tekrar kurulmasına neden olmuştur. Karşılaşılan bu farklılığın, yaz döneminde sulamaya ara verilmesi ile birlikte toprağın kuruyup, mikrobiyal faaliyetlerin azalması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Akar zararlısında olduğu gibi, *in vitro* kültür öncesi sera koşullarında pestisit (bakırlı preparat) uygulamaları ile *in vitro* koşullarda karşılaşılan fungus etmeninin kısmen önüne geçilebilmiştir. Tüm bunların yanında endojen bakterilerin neden olduğu enfeksiyon problemlerinin pek çok doku kültürü çalışmasında problemlere neden olduğu bilinmektedir (Anonim, 2019). Çalışma süresince ilerleyen alt kültürlerde ortaya çıkmaya devam eden ve besi ortamına ilave edilen Plant Preservative Mixture (PPM™) veya antibiyotiklerle tam olarak önüne geçilemeyen bakteri kaynaklı enfeksiyonlar, bunlara endojen bakterilerin neden olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanında çalışma süresince karşılaşılan fungus kaynaklı enfeksiyonların, yalnızca *in vitro* kültür başlangıcında ortaya çıktığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. A) *İn vitro* kültür başlangıcında karşılaşılan fungus kaynaklı enfeksiyonlar
B) Alt kültürlerde ortaya çıkan bakteri kaynaklı enfeksiyonlar

Bununla birlikte doku kültürü uygulamalarında sterilizasyon için sıklıkla kullanılan ticari sodyum hipoklorit çözeltilerinin aktif klorür oranları net olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmalarda, sahip oldukları kimyasal bileşen oranları kesin olarak bilinen $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, H_2O_2 veya HgCl_2 gibi sterilizasyon ajanlarının kullanımı ile daha yüksek başarı elde edilebilmektedir.

4.2. Uygun Eksplant Büyüklüğünün Belirlenmesine Ait Bulgular

Denemede, farklı genişlik (1 x 2 cm, 1 x 1 cm, 1 x 0.5 cm ve 0.5 x 0.5 cm) ve kalınlıkta (1, 2 ve 3 mm) kesilen *C. persicum* türüne ait yumru parçalarının rejenerasyon yetenekleri incelenmiştir. Denemede yalnızca eksplantların kallus oluşturma yetenekleri (oranları) gözlenmiştir. Yapılan gözlemlerde, yumru kesitinin alanına bağlı olmaksızın tüm eksplantlarda kallus gelişimi gözlenmiştir. Ancak eksplant kalınlığı azaldıkça rejenerasyon oranının düştüğü ve 1 mm kalınlığındaki eksplantların hiç birinde kallus gelişiminin olmadığı görülmüştür. Buna karşın, yaklaşık 3 mm kalınlığa sahip tüm yumru parçaları kallus oluşturmuştur. Kalınlıkları yaklaşık 2 mm olacak şekilde hazırlanan eksplantlarda ise % 80 oranında kallus elde edilmiştir. *In vitro* siklamen üretimi üzerine çalışan ilk araştırmacılardan olan Okumoto ve Tabakayashi (1969), çalışmalarında 1 cm³ boyutlarında kesilmiş yumru parçalarını kullanmışlardır. Ancak bu şekilde bir yumrudan alınabilecek eksplant miktarı ciddi şekilde azalmaktadır. Daha yakın dönemlerde ise TLC tekniği süs bitkileri üretiminde, zambak, Afrika menekşesi, glayöl, begonya ve daha pek çok türde başarılı şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Zambak üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda, embriyojenik kallus elde etmek için 0.8 - 1 mm kalınlığındaki soğan kesitleri başarılı bir şekilde kullanılırken (Marinangeli, 2016), yaprak kesiti için 0.3 mm, gövde kesiti için ise 2 - 3 mm kalınlığındaki eksplantlar kullanılmıştır (Teixeira da Silva, 2003). Benzer şekilde, *in vitro* koşullarda yetiştirilen glayöl yumrularından alınan 0.3 - 0.5 mm kalınlığındaki kesitler kitlesel üretim için başarılı bir şekilde kullanılabilir. Ancak Afrika menekşesinde *in vitro* kitlesel üretim için 3 x 3

mm ebadında yaprak eksplantları veya 0.3 - 0.5 mm kalınlığında kesilmiş petiollerin kullanıldığı bildirilmiştir (Teixeira da Silva, 2003). Geranium melezi (*Pelargonium x hortorum*) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada, TCL tekniği ile 1x10mm boyutunda kesilen hipokotil yapıları, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Hipokotil eksplantının kullanıldığı çalışmalarda genelde tek hipokotilden tek bir eksplant elde edilirken, bu şekilde tek hipokotilden 10 adede kadar çıkabilen sayıda eksplant elde etmek mümkün olmuştur (Gill ve ark., 1992;). Özellikle genotip etkisinin ciddi farklılıklara yol açtığı doğal türlerin kullanıldığı çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, tek bitkiden mümkün olan en yüksek sayıda eksplant temin etmenin önemi, olası genotip farklılıklarını gözlemleyebilmek açısından büyük önem taşımaktadır.

In vitro çalışmalarda kullanılacak başlangıç materyalleri için optimum eksplant boyutunun türlere ve eksplantın alındığı organa göre değiştiği görülmektedir. Doktora tez çalışması kapsamında, siklamen yumruları için 0.5 cm² büyüklük yeterli bulunurken, eksplant kalınlığının 2 mm'nin altına düşmemesi gerektiği tespit edilmiştir. Bu şekilde tek yumrudan elde edilen eksplant miktarı maksimize edilmiş olsa da, *C. cilicium* ve *C. coum* gibi türlerde doğal yumru boyutlarının yeterli büyüklükte olmaması nedeni ile her zaman tek genotipten yeterli sayıda eksplant elde etmek mümkün olmamıştır.

4.3. Farklı Dönemlerde Kültüre Alınan Türlerle Ait Rejenerasyon Bulguları

Bu bölümde, çiçeklenme ve dinlenme dönemi olmak üzere iki farklı dönemde *in vitro* kültüre alınan türlere ait bulgulara yer verilmiştir. Türler arasında büyük ölçüde rejenerasyon farklılığı bulunduğu için dönemsel denemelerde elde edilen sonuçlar tür bazında ayrı ayrı sunulmuştur.

4.3.1. *C. persicum* Türüne Ait Bulgular

C. persicum türüne ait yumru parçaları kullanılarak kurulan *in vitro* rejenerasyon denemeleri, çiçeklenme ve dinlenme dönemi olmak üzere iki farklı vejetasyon döneminde kurulmuştur. Denemelerde somatik embriyo yapılarını elde etmek için farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (2,4-D (0, 0.5, 1.0 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹) ve 2iP'nin (0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹)) içeren ½ MS besi ortamı kullanılmıştır. Denemelerde somatik embriyo yapılarından çok organojenik yapılar elde edilmiştir. Bu nedenle ilerleyen denemelere, 2,4-D ve 2 iP'nin yanı sıra 1/3 oranında olacak şekilde IBA/ BA dâhil edilmiştir (sırasıyla; 0.1 + 0.3, 0.3 + 0.9, 0.5 + 1.5 ve 0.8 + 2.4 mg L⁻¹). Denemelerde genel olarak genotipler arası farklılığı ortadan kaldırmak için, tüm dozların tek yumru ile kurulmasına çalışılmıştır. Ancak gerek yumruların yeterli büyüklükte olmaması gerekse enfeksiyona bağlı doz kayıpları nedeni ile her denemede bu sağlanamamıştır.

4.3.1.1. *C. persicum* Türüne Ait Birinci Çiçeklenme Dönemi Bulguları

Deneme, *C. persicum* türünün çiçekli olduğu nisan ayı içerisinde kurulmuştur. Sterilizasyon işleminin ardından yaklaşık 0.5 x 0.5 cm genişlikte ve 3 mm kalınlıkta parçalara ayrılan yumrular, her petride 5 adet olacak şekilde kültüre alınmıştır. Denemede, kontrol parseli ile birlikte toplam 17 farklı kombinasyon (2,4-D; 0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg L⁻¹ ve 2iP; 0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) yer almış ve her kombinasyon için 5 petri (tekerrür) kullanılmıştır.

Deneme genelinde kullanılan petrilerin % 27'sinde enfeksiyon gelişimi gözlenmiştir (bir petride yer alan 5 eksplanttan bir tanesi dahi enfekte olsa, o petri enfekte olarak ayrılmıştır). Bu oran, kullanılan eksplant sayısı göz önüne alındığında, % 10 olmuştur. Fungal enfeksiyonlar genel olarak kültüre alma işleminden sonra ilk iki hafta içinde ortaya çıkarak tüm petriyi kaplayacak şekilde hızlı bir yayılım göstermiştir. İlerleyen günlerde ve alt kültürlerde ise yeni fungus oluşumu görülmemiştir. Benzer şekilde bakteri enfeksiyonları da, yoğun olarak ilk

iki hafta içerisinde ortaya çıkmakta ve tüm petriye yayılmaktadır. Ancak funguslardan farklı olarak bakteri enfeksiyonlarının ortaya çıkmasında süreklilik gözlenmiş, kültür başlangıcından 3 - 4 ay sonra bile yeni bakteri enfeksiyonlarının geliştiği görülmüştür. Bunun yanında ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan bakteri enfeksiyonlarının bir kısmı rejenerasyonu aksatmayacak şekilde düşük bir yoğunluk göstererek aklimatizasyon aşamasına kadar bitkiciklerle birlikte varlıklarını devam ettirmişlerdir.

Deneme genelinde, yalnızca bir dozda (2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP) ve tek bir eksplantta somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bunun yanında çoğunlukla organojenik rejenerasyonun gözlendiği kallus dokularından, değişen oranlarda kök ve sürgün yapıları elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Somatik embriyo oluşumu sadece tek eksplantta gözlendiği için BBD dozlarının, SE oluşumuna etkisi istatistiki olarak önemsiz (Prob > F; 0.4664) bulunmuştur.

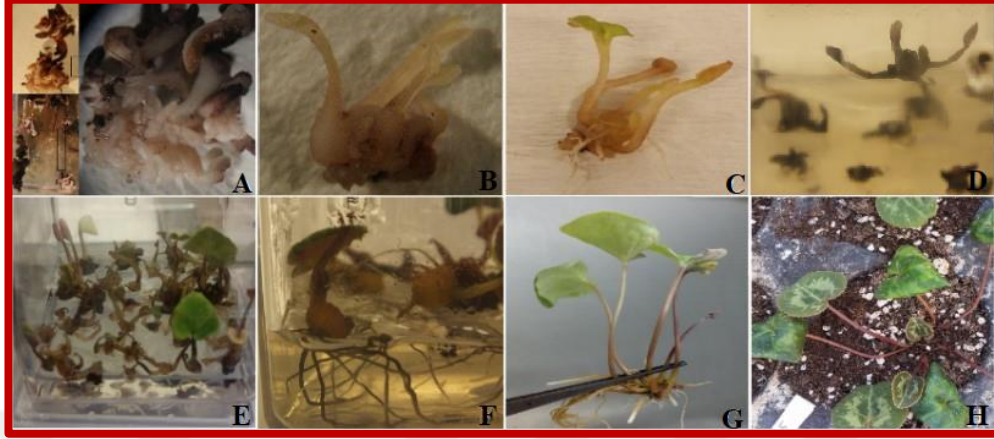


Şekil 4.3. *C.persicum* türünde, ilk yıl çiçeklenme döneminde elde edilen SE yapıları
A) Aynı eksplant üzerinde önce organojenik sonra embriyojenik yapıların gelişiminin gözlenmesi, B) SE yapılarının yakından görünümü

Çizelge 4.3. *C. persicum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme dönemi rejenerasyon bulguları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.5 + 0.1	80 a (72.00)	16 ef (15.46)	8 e (7.85)	0 c (0)
0.5 + 0.3	77 a (67.15)	11 ef (15.44)	7 e (10.13)	0 c (0)
0.5 + 0.5	76 a (66.68)	17 de (19.15)	0 e (0)	0 c (0)
0.5 + 0.8	44 b (41.31)	8 ef (7.846)	12 e (10.15)	0 c (0)
1 + 0.1	95 a (84.00)	8 ef (10.62)	9 e (11.31)	0 c (0)
1 + 0.3	48 b (40.84)	0 f (0)	0 e (0)	0 c (0)
1 + 0.5	76 a (66.68)	4 ef (5.32)	0 e (0)	0 c (0)
1 + 0.8	36 b (30.68)	20 def (18.00)	0 e (0)	0 c (0)
1.5 + 0.1	80 a (72.00)	4 ef (5.313)	0 e (0)	0 c (0)
1.5 + 0.3	96 a (84.68)	77 ab (67.48)	52 c (49.15)	28 b (25.62)
1.5 + 0.5	92 a (82.15)	79 a (71.66)	74 ab (65.53)	28 b (25.84)
1.5 + 0.8	100 a (90.00)	81 ab (69.78)	84 a (74.30)	0 c (0)
2 + 0.1	100 a (90.00)	72 ab (67.16)	64 bc (56.53)	52 a (43.37)
2 + 0.3	100 a (90.00)	34 cd (35.84)	59 c (50.41)	4 c (5.31)
2 + 0.5	92 a (82.15)	58 bc (53.07)	37 d (31.01)	36 ab (30.68)
2 + 0.8	100 a (90.00)	42 c (40.15)	71 abc (60.46)	24 b (23.31)
Toplam BBD	80.75 (71.90)	33.35 (31.40)	29.85 (26.68)	10.75 (9.63)

LSD_{Kallus}=23.957; ***LSD_{Sürgün}=18.197; ***LSD_{Kök}=14.352; ***LSD_{Bitkicik}=16.702; ()p<0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur); Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.



Şekil 4.4. *C. persicum* türüne ait somatik embriyo yapılarının gelişim aşamaları. A) Kallus yapılarından embriyoların oluşmaya başlaması. B) Hormonlu ortamda çimlenmeye başlayan embriyolar. C) Köklerin oluşması. D) Hormonsuz ortama aktarılan çimlenmiş embriyo yapıları. E) Hormonsuz ortamda gelişmeye devam eden bitkicikler. F) Yumruların belirginleşmesi. G) Alıştırma aşamasına ulaşan bitkicik. H) Dikimi gerçekleştirilen somatik embriyo yöntemi ile elde edilmiş bir bitkicik

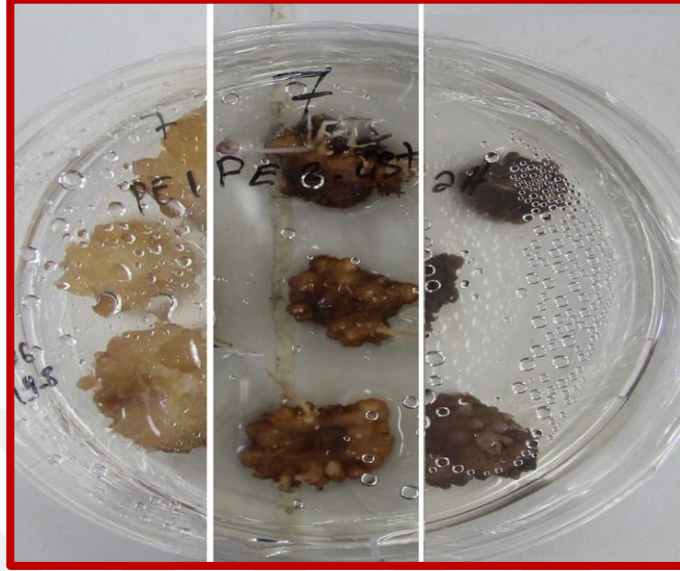
C. persicum türüne ait 3 farklı yumrunun (genotipin) eksplant kaynağı olarak kullanıldığı denemede, BBD dozlarının rejenerasyona etkisi istatistikî olarak $p < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm BBD dozları bir arada değerlendirildiğinde, eksplantların % 80.75 oranında kallus oluşturduğu görülmüştür. Deneme genelinde eksplantların % 33.35'inde sürgün oluşumu gözlenirken, kök oluşumu gözlenen eksplantlar için oran % 29.85 olarak tespit edilmiştir. Kültüre alınan eksplantlardan % 10.75'i sürgün yapısı ile birlikte kök yapısı da geliştirerek bitkiciğe dönüşmüştür. En yüksek bitkicik oranı, kültüre alınan eksplantların yarısının (%52) bitkiciğe dönüştüğü başlangıç aşamasında 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} 2iP kullanılan besi ortamından elde edilmiştir. Deneme genelinde bitkiciğe dönüşen eksplantların yaklaşık yarısında (% 48) BBD içermeyen $\frac{1}{2}$ MS ortamında sürgün yapıları ile birlikte kök oluşumları gözlenirken, kök oluşturmayan sürgün yapıları 2 mg L^{-1} IBA içeren besi ortamına alınarak köklenmeleri sağlanmıştır. Aklimatizasyon aşamasında karşılaşılan enfeksiyon nedeni ile bu

denemede elde edilen bitkiciklerin tamamı dış ortama alıştırma aşamasında kaybedilmiştir.



Şekil 4.5. *C. persicum* türünde oluşmaya başlayan sürgün yapılarının A) 8. hafta ve B) 16. haftadaki genel görünümü

Denemede kullanılmış olan yumru büyüklüklerinin tek genotip ile tüm dozlara ait tekerrürlerin kurulması için yeterli olmaması nedeni ile kullanılmış olan 3 genotip bir arada değerlendirilmiştir. Benzer şekilde enfeksiyon kayıpları bazı BBD dozlarında 1 genotipe ait tüm tekerrürlerin yok olmasına neden olduğu için tekerrürlerdeki genotip sayılarını (oranlarını) homojen tutmak mümkün olmamıştır. Ancak gözlem aşamasında genotipler arasında gerek kallus oluşumu (Şekil 4.6) gerek ise rejenerasyon tepkileri bakımından farklılıklar olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. *C. persicum* türüne ait farklı genotiplerin oluşturduğu farklı kallus tipleri. A) Açık kahve-sarı renkli dağınık, pamuk dokulu kallus yapısı, genellikle organ oluşumu gözlenmemekle birlikte nadiren kök yapıları oluşturabilmektedir. B) Kahverengi kompakt kallus yapısı, sürgün veya kök oluşumu gözlenmekte, nadiren kallus olarak kalan yapılar C) Koyu kahverengi ve kompakt, ilerleyen alt kültürlerde karararak ölen kallus yapıları

4.3.1.2. *C. persicum* Türüne Ait İlk Yıl Dinlenme Dönemi Bulguları

C. persicum türüne ilişkin ilk yıl dinlenme dönemi denemesi, diğer bütün türlere ait yumrularla birlikte, çiçeklenme dönemini takip eden yaz aylarında, bitkilerin dinlenmeye girmesinden hemen sonra kurulmuştur. Bir önceki denemede yüksek oranda organojenik yapılar oluşması nedeni ile yumrular yatay eksende iki parçaya bölünerek ayrı ayrı kültüre alınmış ve rejenerasyon farklılıkları gözlenmiştir. Bu şekilde kök yapılarının oluştuğu yumrunun alt bölgesi ile toprak üstü organların oluştuğu, yumruların üst bölgesi arasında meydana gelmesi beklenen rejenerasyon (kök ve sürgün oluşumu) farklılıkları tespit edilmek istenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kallus, sürgün, kök ve bitkicik oranları olmak üzere farklı çizelgelerde (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7) sunulmuştur.

Çizelge 4.4. *C. persicum* türünde ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen kallus oluşum oranları

Kallus oluşumu (%)			
BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Eksplantın alındığı yumru bölgesi		Toplam BBD Dozu
	Alt	Üst	
0.5+0.1	88 (74.06)	69 (56.81)	78.5 b (65.43)
0.5+0.3	96 (84.68)	100 (90)	98 a (87.37)
0.5+0.5	84 (68.74)	100 (90)	92 ab (79.37)
0.5+0.8	68 (61.84)	80 (72)	74 b (66.92)
1+0.1	100 (90)	80 (72)	90 ab (81.00)
1+0.3	84 (77.31)	84 (77.31)	84 ab (77.31)
1+0.5	100 (90)	92 (82.15)	96 a (86.07)
1+0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
1.5+0.1	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
1.5+0.3	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
1.5+0.5	92 (82.15)	100 (90)	96 a (86.07)
1.5+0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
2+0.1	100 (90)	80 (72)	90 ab (81.00)
2+0.3	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
2+0.5	100 (90)	96 (84.68)	98 a (87.37)
2+0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)
Toplam Bölge	94.5 (84.3)	92.56 (82.93)	93.53 (83.62)

*LSD_{BBD}=16.052; LSD_{Bölge}=Ö.D.; LSD_{BBD*Bölge}=Ö.D.; (*p<0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur); Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Buna göre kallus oluşumu bakımından yumrunun alt ve üst bölgeleri arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmezken, deneme genelinde kullanılan eksplantlardan % 93.53 oranında kallus elde edilmiştir. Bunun yanında besi ortamına ilave edilen farklı BBD konsantrasyonlarının kallus oluşumu üzerine olan etkisinin p<0.5 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Denemede toplam 6 farklı BBD dozunda (sırası ile 2,4-D + 2iP; 1 + 0.8, 1.5 + 0.1, 1.5 + 0.3, 1.5 + 0.8, 2 + 0.3 ve 2 + 0.8 mg L⁻¹) % 100 oranında, tüm eksplantlarda kallus elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. *C. persicum* türüne ait ilk yıl dinlenme döneminden elde edilen sürgün oluşum oranları

Sürgün oluşumu (%)			
BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Eksplantın alındığı yumru bölgesi		Toplam BBD Dozu
	Alt	Üst	
0.5+0.1	28 (31.63)	32 (33.93)	30 f (32.78)
0.5+0.3	32 (34.16)	36 (36.24)	34 f (35.21)
0.5+0.5	48 (43.84)	36 (36.47)	42 def (40.15)
0.5+0.8	36 (36.47)	44 (41.31)	40 def (38.89)
1+0.1	60 (48.21)	48 (46.62)	54 cdef (47.42)
1+0.3	40 (32.99)	40 (39)	40 ef (36.00)
1+0.5	54 (47.3)	60 (50.99)	57 cdef (49.15)
1+0.8	80 (72)	56 (51.46)	68 abcd (61.73)
1.5+0.1	84 (71.52)	84 (71.52)	84 abc (71.52)
1.5+0.3	68 (61.84)	64 (59.31)	66 abcde (60.58)
1.5+0.5	88 (74.06)	88 (74.06)	88 ab (74.06)
1.5+0.8	92 (79.37)	92 (79.37)	92 a (79.37)
2+0.1	56 (51.46)	56 (48.68)	56 bcdef (50.07)
2+0.3	56 (48.68)	52 (46.15)	54 cdef (47.42)
2+0.5	63 (55.62)	48 (43.84)	55.5 bcdef (49.73)
2+0.8	55 (48)	61.4 (51.82)	58.2 bcdef (49.91)
Toplam Bölge	58.75 (52.32)	56.09 (50.67)	57.42 (51.50)

LSD_{BBD}=24.670; LSD_{Bölge}=Ö.D.; LSD_{BBD*Bölge}=Ö.D.; (p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur); Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Besi ortamına ilave edilen farklı BBD konsantrasyonları, sürgün oluşumu üzerinde p<0.01 düzeyinde etkili bulunurken, BBD*Alındığı Bölge (eksplantın alındığı alt ve üst yumru bölgeleri) interaksiyonu sürgün oluşumu üzerinde istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Benzer şekilde, yumrunun alt (% 58.75) ve üst (% 56.09) bölgeleri arasındaki sürgün oluşturma oranı farklılığı da istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte, en yüksek sürgün oluşum oranı, 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ iP ilave edilen besi ortamında gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. *C. persicum* türüne ait ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen kök oluşum oranları

Kök oluşumu (%)			
BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Eksplantın alındığı yumru bölgesi		Toplam BBD Dozu
	Alt	Üst	
0.5+0.1	8 (10.62)	12 (13.15)	10 cd (11.89)
0.5+0.3	0 (0)	0 (0)	0 d (0)
0.5+0.5	20 (26.56)	20 (20.77)	20 bcd (23.67)
0.5+0.8	32 (28.37)	36 (33.69)	34 abc (31.03)
1+0.1	60 (53.77)	68 (56.06)	64 a (54.91)
1+0.3	44 (41.53)	40 (38.78)	42 ab (40.15)
1+0.5	28 (28.62)	28 (28.62)	28 bc (28.62)
1+0.8	28 (25.84)	32 (28.15)	30 bc (27.00)
1.5+0.1	32 (28.37)	45 (42)	38.5 abc (35.19)
1.5+0.3	32 (31.15)	40 (36)	36 abc (33.58)
1.5+0.5	28 (28.62)	24 (26.09)	26 bc (27.35)
1.5+0.8	52 (46.15)	56 (48.46)	54 ab (47.30)
2+0.1	48 (43.62)	40 (32.99)	44 ab (38.30)
2+0.3	24 (23.31)	30.67 (27.36)	27.33 bc (25.33)
2+0.5	26 (24.69)	28 (25.84)	27 bc (25.26)
2+0.8	30 (27)	40 (36)	35 abc (31.50)
Toplam Bölge	30.75 (29.26)	33.71 (30.87)	32.24 (30.07)

LSD_{BBD} = 24.046; LSD_{Bölge} = Ö.D.; LSD_{BBD*Bölge} = Ö.D.; (p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur) Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Deneme genelinde, % 32.24 oranında kök oluşumu gözlenirken, bu oranın sürgün oluşum oranının (% 57.42) altında olduğu görülmüştür. Denemede elde edilen alt ve üst bölgelerdeki kök oluşum oranları arasındaki (sırası ile % 30.75 ve % 33.71) farklılık istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Benzer şekilde, BBD*Alındığı Bölge interaksyonu da kök oluşumu üzerine istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bunun yanında, ortama ilave edilen BBD dozlarının kök

rejenerasyonu üzerine olan etkisinin $p < 0.01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. *C. persicum* türüne ait ilk yıl dinlenme döneminde elde edilen bitkicik oranları

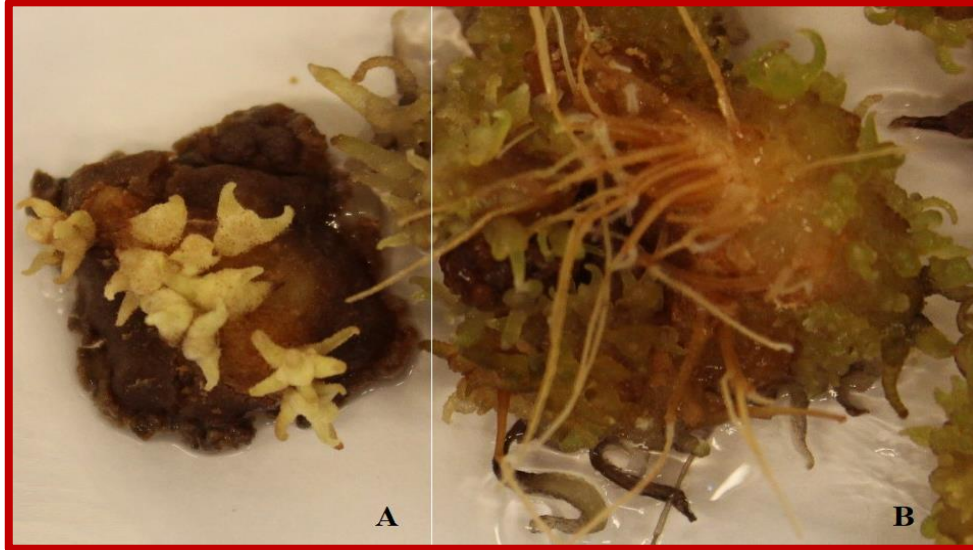
Elde edilen bitkicik oranı (%)			
BBD (mg L ⁻¹) 2.4-D + 2iP	Eksplantın alındığı yumru bölgesi		Toplam BBD Dozu
	Alt	Üst	
0.5+0.1	0 (0)	4 (5.32)	2 fg (2.65)
0.5+0.3	0 (0)	0 (0)	0 g (0)
0.5+0.5	12 (13.15)	8 (10.62)	10 efg (11.89)
0.5+0.8	28 (22.84)	32 (28.15)	30 defg (25.49)
1+0.1	56 (48.68)	60 (54)	58 abcd (51.34)
1+0.3	32 (25.37)	32 (25.37)	32 defg (25.37)
1+0.5	64 (56.53)	68 (58.84)	66 ab (57.68)
1+0.8	84 (74.3)	88 (76.84)	86 a (75.57)
1.5+0.1	36 (30.68)	32 (30.93)	34 cde (30.81)
1.5+0.3	8 (7.846)	8 (10.62)	8 ef (9.236)
1.5+0.5	52 (46.15)	32 (31.15)	42 bcd (38.65)
1.5+0.8	32 (31.15)	32 (30.93)	32 bcde (31.04)
2+0.1	40 (36)	36 (30.46)	38 bcde (33.23)
2+0.3	32 (28.15)	32 (25.37)	32 def (26.76)
2+0.5	68 (58.84)	64 (51.46)	66 abc (55.15)
2+0.8	56 (48.68)	56 (48.68)	56 bcd (48.68)
Toplam Bölge	37.5 (33.02)	36.5 (32.42)	37.00 (32.72)

LSD_{BBD}=2.644; LSD_{Bölge}=Ö.D.; LSD_{BBD*Bölge}=Ö.D.; () $p < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur); Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Denemeye ilişkin diğer rejenerasyon oranlarına paralel olarak, eksplantın alındığı alt ve üst yumru bölgelerindeki bitkiye dönüşüm oranları arasındaki farklılık (sırasıyla % 37.5 ve % 36.5) istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Denemede en

yüksek bitkicik oluşumu, % 86 oranı ile 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2 iP ilave edilmiş besi ortamından gözlenmiştir. Deneme genelinde % 37 olarak gözlenen bitkiciğe dönüşüm oranının, ilk yıl çiçeklenme döneminde elde edilmiş olan % 10.75 oranına nazaran yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bir önceki denemede olduğu gibi bu denemede de yumru büyüklüğü ve enfeksiyon kayıpları gibi nedenler, farklı genotiplerin bir arada değerlendirmeye alınmasını zorunlu kılmıştır. Genotiplerin istatistiki olarak ayrı değerlendirilebilmesi için yeterli sayıda tekerrür miktarına ulaşamamış olmakla birlikte, gözlem aşamasında genotipler arası rejenerasyon farklılıkları net olarak saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *C. persicum* türüne ait iki farklı genotipin, 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP ortamında göstermiş oldukları farklı rejenerasyon tepkileri. A) Az miktarda koyu kahverengi kallus dokusu ve üzerinde gelişen sürgün yapıları ile B) Yoğun miktarda açık kahverengi kallus dokusu ve üzerinde gelişmekte olan kök ve sürgün yapıları

4.3.1.3. *C. persicum* Türüne Ait İkinci Yıl Çiçeklenme Dönemi Bulguları

Çalışmanın ikinci yılında, ilk yıl kurulmuş olan denemeler, farklı BBD konsantrasyonları ilave edilerek tekrar edilmişlerdir.

Çizelge 4.8. *C. persicum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme dönemine ait rejenerasyon oranları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.5 + 0.1	80 abc (72)	8 ef (7.85)	8 d (7.84)	0 c (0)
0.5 + 0.3	77 bc (67.15)	0 f (0)	7.4 d (10.18)	0 c (0)
0.5 + 0.5	100 a (90)	9 def (11.31)	0 d (0)	0 c (0)
0.5 + 0.8	44 de (41.31)	0 f (0)	12 d (10.15)	0 c (0)
1 + 0.1	95 ab (84)	8 def (10.62)	4 d (5.31)	0 c (0)
1 + 0.3	48 de (40.84)	0 f (0)	0 d (0)	0 c (0)
1 + 0.5	80 abc (72)	0 f (0)	0 d (0)	0 c (0)
1 + 0.8	24 ef (23.31)	0 f (0)	0 d (0)	0 c (0)
1.5 + 0.1	64 cd (59.31)	0 f (0)	0 d (0)	0 c (0)
1.5 + 0.3	96 ab (84.68)	48 b (43.84)	44 c (41.31)	28 b (25.62)
1.5 + 0.5	100 a (90)	88 a (79.84)	68.6 a (62.19)	28 b (25.84)
1.5 + 0.8	100 a (90)	87 a (79.01)	64 ab (56.3)	0 c (0)
2 + 0.1	100 a (90)	72 a (67.16)	48 bc (43.62)	52 a (43.37)
2 + 0.3	100 a (90)	27 bcd (27.98)	46.8 bc (42.97)	4 c (0)
2 + 0.5	100 a (90)	34 bc (29.48)	46.2 c (36.85)	36 ab (30.68)
2 + 0.8	100 a (90)	47 b (43.15)	63 ab (55.62)	24 b (23.31)
BBD (mg L ⁻¹) IBA + BA	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.1 + 0.3	100 a (90)	20 cde (18)	2 d (2.65)	0 c (0)
0.3 + 0.9	66 cd (59.19)	30 bcd (27)	4 d (3.92)	0 c (0)
0.5 + 1.5	36 ef (33.46)	0 f (0)	8 d (7.73)	0 c (0)
0.8 + 2.4	16 fg (15.57)	2 ef (2.66)	2 d (2.65)	0 c (0)
1.0 + 3.0	0 g (0)	0 f (0)	0 d (0)	0 c (0)
Toplam BBD	72.67 (79.00)	22.86 (21.33)	20.38 (18.54)	8.19 (7.09)

***LSD_{Kallus}=21.283; ***LSD_{Sürgün}=17.509; ***LSD_{Kök}=14.054 ***LSD_{Bitkicik}=14.549;
(*** p<0.001 düzeyinde önemli)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Yumruların alt ve üst bölgelerinden alınan eksplantlar arasında rejenerasyon yetenekleri bakımından istatistiki olarak önemli bir farklılık tespit edilmediği için

takip eden denemelerde bu uygulamaya devam edilmemiştir. Denemede yeterli tekerrür miktarına ulaşabilmek için birden çok genotip (yumru) kullanılmıştır. Bunun yanında, önceki denemelerde yüksek oksin/sitokinin oranı ile oluşan kalluslardan organojenik yapıların gelişmiş olması ve % 50 oranında sürgün gelişimlerinin gözlenmesi nedeni ile farklı bitki büyüme düzenleyiciler denemelere dâhil edilmiştir. Bunun için ticari sıklamen üretiminde inbred hatların *in vitro* çoğaltılması aşamasında sıklıkla kullanılan IBA ve BA, oksin/sitokinin oranı 1/3 olacak şekilde besi ortamlarına ilave edilerek yumru eksplantlarının tepkileri incelenmiştir.

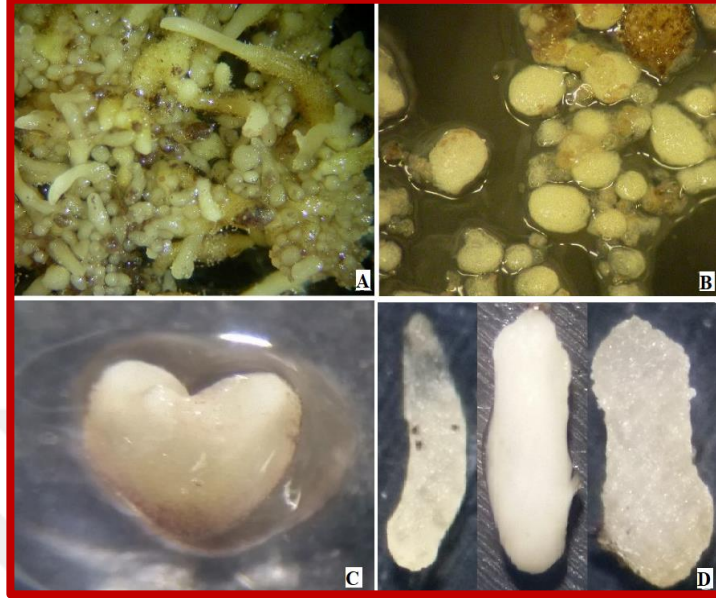
IBA + BA (sırasıyla 0.1 + 0.3, 0.3 + 0.9, 0.5 + 1.5, 0.8 + 2.4 ve 1.0 + 3.0 mg L⁻¹) ilave edilmiş besi ortamlarında 0.1 + 0.3 mg L⁻¹ IBA + BA konsantrasyonunda % 100 oranında kallus elde edilmiştir. Ancak gözlenen sürgün oranı beklenenin oldukça altında kalmış olup, en yüksek oran % 30 olarak 0.3 + 0.9 mg L⁻¹ IBA + BA ilave edilmiş olan besi ortamında elde edilmiştir. 1/3 oranında oksin/sitokinin kullanımında düşük oranlarda (en çok % 8) kök gelişimlerinin olduğu gözlenmiştir. Ancak IBA + BA kullanımında elde edilmiş olan sürgün yapılarından kök yapıları oluşmamış ve bu sürgünlerden sağlıklı bitkicikler elde edilememiştir. Bu nedenle IBA ve BA ilave edilmiş olan besi ortamlarında gelişmiş olan sürgün yapıları aklimatizasyon denemelerinde yer almamıştır. Birden çok *C. persicum* yumrusunun kullanıldığı ikinci yıl çiçeklenme dönemi denemesinde, deneme genelinde % 72.67 oranında kallus, % 22.86 oranında sürgün, % 20.38 oranında kök rejenerasyonu gözlenmiştir. Deneme genelinde kullanılan eksplantların, % 8.19'undan bitkicik elde edilmiş olup, aklimatizasyon için yeterli kök oluşumu gösterenler dış koşullara aktarılmıştır. Yumru eksplantları kullanılarak kurulmuş olan denemede, 2,4-D + 2iP ilave edilmiş olan besi ortamında gözlenen *C. persicum* türüne ait organojenik yapıların farklı haftalardaki gelişim aşamaları Şekil 4.8'da görülmektedir.



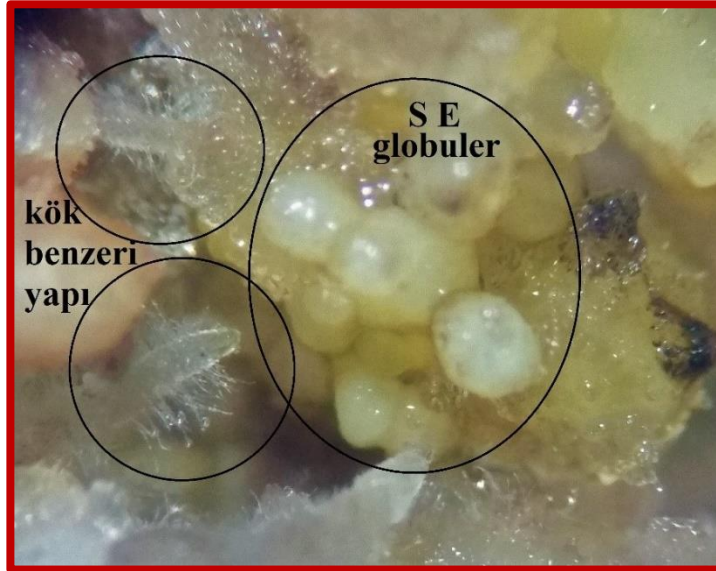
Şekil 4.8. *C. persicum* türünde organogenesis aşamaları A) İlk 8 haftada farklılaşmaya başlayan kallus yapıları (B) 8-10 hafta arasında İlk yaprak taslaklarının ortaya çıkması (C) İkinci alt kültür aşamasında, 16. haftadaki yaprak gelişimleri D) Karanlık ortamda gelişmeye devam eden sürgün yapıları (E) 16-20. haftada aydınlık ortamda gelişen sürgünlerin görünümü. (F) 24. haftada aklimatizasyon aşaması için yeterli kök oluşumunu tamamlamış bitkicik

4.3.1.4. *C. persicum* Türüne Ait İkinci Yıl Dinlenme Dönemi Bulguları

C. persicum türü ile kurulmuş olan son rejenerasyon denemesinde embriyojenik kallus elde etmek için yüksek tutulan oksin / sitokinin oranının yanı sıra sürgün oluşumunu arttırmak için 1/3 oranında IBA + BA kullanımına devam edilmiştir. Kurulmuş olan denemede diğer denemelerden farklı olarak, 1.5 + 0.8 mg L⁻¹ 2,4-D + 2iP ve 2.0 + 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 2iP ilave edilmiş olan iki besi ortamında SE yapılarının geliştiği gözlenmiştir. Bir önceki SE gelişiminde olduğu gibi bu yapılar tek bir tekrürde ve tek eksplant üzerinde gözlenmişlerdir. Bu nedenle yapılmış olan istatistiki analizde, BBD dozlarının SE oluşumu üzerine olan etkisi önemsiz bulunmuştur (Prob>F; 0.5332). Bununla birlikte, SE yapılarının iki ortamda farklı şekillerde ortaya çıktığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

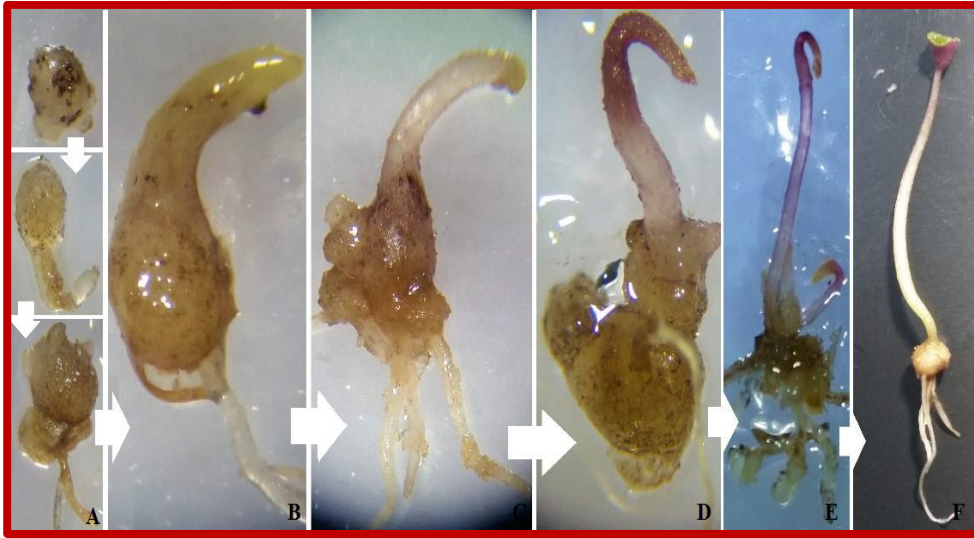


Şekil 4.9. *C. persicum* türünde, 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP içeren besi ortamında gözlenen embriyo yapıları (A) Somatik embriyoların bir arada görünümü, (B) Globuler aşamada bulunan embriyo yapıları, (C) Kalp aşamasında bulunan SE yapıları D) Torpedo aşamasında bulunan SE yapıları



Şekil 4.10. Kök benzeri yapıların yer aldığı eksplant üzerinde globuler SE yapılarının ortaya çıkışı (1.5 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP)

BBD konsantrasyonunun 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP olduğu ortamda, açık sarı renkli embriyogenik kalluslar üzerinde yalnızca SE yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Ancak $1.5 + 0.8 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + 2iP içeren ortamda gelişen kallus üzerinde kök benzeri yapılar ile globuler aşamada bulunan somatik embriyoların bir arada buldukları gözlenmiştir (Şekil 4.10). Ardından, aynı noktada hızla artan sayıda ve farklı gelişim evresinde, embriyolar oluşmaya devam etmiştir. Bununla birlikte, *C. persicum* türünden elde edilmiş olan bu SE yapılarının büyük bölümü, diğer sıklamen türlerine ait SE yapılarından farklı olarak, BBD içermeyen besi ortamına alınmadan önce çimlenmeye başlamıştır. Çimlenme görülmeyen SE yapıları ise alt kültür işleminde BBD içermeyen besi ortamlarına dağıtılarak çimlenme ve bitkiciğe dönüşümleri sağlanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *C. persicum* türüne ait bir globuler embriyonun bitkiciğe dönüşümü. A) Çimlenerek kök yapısının oluşması, B) ve C) Yeni gelişmekte olan sürgün yapısı D) ve F) Yaprığın belirginleşmeye başlaması, F) Kök, yumru ve yaprak yapıları tam olarak oluşmuş bir bitkicik

Elde edilmiş olan bu SE yapılarından gelişmiş olan bitkicikler, herhangi bir BBD ilavesine ihtiyaç duymadan yeterli miktarda kök yapısı oluşturmuştur.

Ardından bu bitkicikler, organogenesis yöntemi ile üretilmiş olan diğer bitkiciklerle birlikte başarılı bir şekilde dış ortama aktarılmışlardır.

Denemede BBD dozlarına bağlı olarak değişen oranlarda organojenik yapıların rejenere olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9). Denemede elde edilmiş olan toplam kallus oranı % 81.21 olarak gözlenirken, 5 farklı BBD dozunda % 100 oranında kallus gelişimi kaydedilmiştir. En yüksek sürgün oluşum oranı, % 90.33 ile 1.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP ilave edilmiş olan besi ortamında gözlenmiştir. Kök oluşumları incelendiğinde ise % 57 olarak tespit edilen en yüksek kök oluşum oranı, 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} 2iP içeren besi ortamından gözlenmiştir. BBD dozlarının bitkicik oluşumu üzerine olan etkileri incelendiğinde ise en yüksek bitkicik oranının, 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP içeren ortamda % 72 oranında gerçekleştiği görülmüştür. IBA + BA kullanımında ise elde edilmiş olan rejenerasyon oranları, 2,4-D ve 2iP kullanımında elde edilenlerin oldukça altında olduğu gözlenmiştir. Sitokinin oranının 1/3 olduğu IBA-BA kullanımında, kök oluşumu gözlenmemiş ve bu bitki büyüme düzenleyicilerin kullanımında bitkicik elde edilememiştir.

Çizelge 4.9. *C. persicum* türüne ait ikinci yıl dinlenme dönemi rejenerasyon oranları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.5 + 0.1	73 de (60.26)	22 fghi (22.15)	20 def (19.61)	2 gh (2.65)
0.5 + 0.3	74 bcde (64.03)	36 efg (31.15)	7.33 ef (8.83)	2 gh (2.65)
0.5 + 0.5	89 abcd (77.31)	41.83 efg (39.68)	8 ef (9.23)	11 fgh (9.57)
0.5 + 0.8	74 cde(62.41)	52 de (44.52)	14 def (14.42)	24 cdef (21.68)
1 + 0.1	90 ab (81)	74 abcd (66.68)	27.66 bcde (25.62)	26 cdef (23.31)
1 + 0.3	100 a (90)	84 a (73.03)	15.66 def(15.69)	12 fgh (10.15)
1 + 0.5	96 a (86.07)	82.33 ab (69.11)	23.66 cde(23.06)	55.33 ab (49.15)
1 + 0.8	100 a (90)	90.33 a (76.96)	16 def (18)	52 ab (48.29)
1.5 + 0.1	80 bcde (67.71)	30 efg (27)	40 abcd (36.11)	0 h (0)
1.5 + 0.3	84 abcd(75.99)	46 ef (41.71)	36 abcd (33.58)	8 fgh (7.84)
1.5 + 0.5	90 ab (81)	44.66 efg (40.15)	28 bcde (28.37)	39 bcde (36.81)
1.5 + 0.8	100 a (90)	54 bcde (47.65)	53 ab (46.73)	22 efgh (17.76)
2 + 0.1	90 abc (79.49)	49 ef (43.03)	57 a (50.65)	43.66 bcd (39.67)
2 + 0.3	100 a (90)	52.33 cde (45.01)	52 ab (46.15)	50.66 abc(43.89)
2 + 0.5	98 a (87)	76 abc (66.92)	50 ab (45)	72 a (61.37)
2 + 0.8	100 a (90)	41.33 efg (38.37)	45.66 abc (43.72)	41.33 bcd (38.37)
BBD (mg L ⁻¹) IBA + BA	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.1 + 0.3	66 ef (56.29)	32 efg (30.68)	0 f (0)	0 h (0)
0.3 + 0.9	74 bcde (66.92)	20 fghi (19.5)	0 f (0)	0 h (0)
0.5 + 1.5	60 ef (54.11)	8 hi (7.73)	0 f (0)	0 h (0)
0.8 + 2.4	46 f (41.19)	0 i (0)	0 f (0)	0 h (0)
1.0 + 3.0	22 g (22.15)	0 i (0)	0 f (0)	0 h (0)
Toplam BBD	81.21 (72.06)	44.56 (39.57)	23.52 (22.13)	21.95 (19.67)

LSD_{Kallus}=18.298LSD_{Sürgün}=22.177; ***LSD_{Kök}=21.877; ***LSD_{Bitkicik}=20.599;

(*** p<0.001 düzeyinde önemli)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

4.3.1.5. *C. persicum* Türüne Ait Dönem Farklılıkları

Tez çalışması süresince, *C. persicum* türüne ait yumru parçaları kullanılarak dinlenme dönemi ve çiçeklenme dönemi olmak üzere iki farklı dönemde, iki yıl süreyle tekrar edilen denemeler kurulmuştur. Kurulmuş olan ilk iki denemede BBD

olarak yalnızca 2,4-D ve 2iP kullanılırken, takip eden iki denemede IBA ve BA çalışmalara dâhil edilmiştir. Bu denemelerde elde edilen rejenerasyon bulguları gözlem aşamasında yüzde değerler olarak kaydedilmiştir. İstatistiki analizler için ise, yüzde değerlere açı dönüşümü yapılarak elde edilmiş veriler kullanılmıştır. İlk yıl ve ikinci yıl verileri kendi aralarında dinlenme ve çiçeklenme dönemi verileri olmak üzere karşılaştırılmış ve dönemler arası rejenerasyon farklılıkları ortaya konulmuştur. Bu bölümde yalnızca dönemler arasındaki toplam rejenerasyon farklılıklarına yer verilmiş olup, BBD, dönem ve BBD*Alındığı Dönem interaksiyonlarını içeren detaylı tablolar Ek 1 ve Ek 2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.10. *C. persicum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem	Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem
93.53 a (83.61)	80.75 b (71.89)	87.14 (77.76)	57.42 a (51.50)	33.35 b (31.39)	45.39 (41.45)
Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem	Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem
32.24 (30.07)	29.85 (26.68)	31.04 (28.38)	37 a (32.72)	10.75 b (9.63)	23.88 (21.18)

Dönemler arası farklılıklar; ***LSD_{Kallus}=5.057; ***LSD_{Sürgün}=5.225; LSD_{Kök}=Ö.D.; ***LSD_{Bitkicik}=21.292; (***)p<0,001 düzeyinde önemli). Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Çizelge 4.11. *C. persicum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem	Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem
89.84 a (79.72)	81.75 b (73.41)	85.79 (76.57)	54.74 a (48.29)	26.73 b (25.02)	40.74 (36.66)
Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem	Dinlenme Dönemi	Çiçeklenme Dönemi	Toplam Dönem
30.88 a (29.05)	25.75 b (23.27)	28.32 (26.16)	28.81 a (25.82)	10.75 b (9.63)	19.78 (17.73)

Dönemler arası farklılıklar; *LSD_{Kallus}=4.857; ***LSD_{Sürgün}=5.318; *LSD_{Kök}=5.168; ***LSD_{Bitkicik}=5.096; (*p<0,05 düzeyinde önemli; ***p<0,001 düzeyinde önemli). Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

İlk yıl denemelerinde, çiçeklenme ve dinlenme dönemlerinde yumruların sahip olduğu rejenerasyon yetenekleri karşılaştırıldığında, kök oluşum oranları bakımından istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır. Diğer yandan kallus, sürgün ve elde edilen bitkicik oranları incelendiğinde, yumru eksplantları arasındaki rejenerasyon farklılığının dinlenme dönemi lehine, p<0.001 düzeyinde önemli olduğu gözlenmiştir.

Benzer şekilde, ikinci yıl tekrar edilen denemelerde de rejenerasyon oranlarının dinlenme döneminde daha yüksek oldukları görülmektedir. İkinci yıl denemelerinde, *in vitro* denemelerin kurulduğu (çiçeklenme ve dinlenme) vejetasyon dönemi, kallus ve kök oluşum oranları üzerinde p<0.05, sürgün ve bitkicik oluşum oranları üzerine ise p<0.001 düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. İlk yıl denemelerinde olduğu gibi, ikinci yılda da rejenerasyon oranlarının dinlenme döneminde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, dinlenme döneminde bulunan *C. persicum* yumrularının, daha yüksek bir *in vitro* rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu açıkça görülmektedir.

C. persicum türüne ilişkin elde edilmiş olan rejenerasyon bulguları incelendiğinde deneme genelinde SE oluşumunun oldukça düşük olduğu görülmektedir. Somatik embriyogenesis yöntemi de özellikle *C. persicum* türünde pek çok araştırmacı tarafından etkin bir *in vitro* üretim sistemi olarak kullanılmıştır (Schwenkel ve Winkelmann 1998; Winkelmann, 2010; Winkelmann ve ark., 2004; Koçak ve ark., 2014; Tagipur ve ark., 2016, İzgü ve ark., 2016). Farklı araştırmacı grupları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmalarda somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitki rejenerasyonunun organogenesis yöntemine nazaran düşük olduğu belirtilmiştir (Tagipur ve ark., 2016). Benzer şekilde gerçekleştirilen tez çalışmasında organogenesis oranı SE oranına nazaran oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak yine de elde etmiş olduğumuz SE oranı istatistiki olarak önemsiz olacak derecede düşüktür. Oranın bu derece düşük olmasının çalışmada kullanılan eksplant kaynağından ve dokuların yaşlı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Etkin SE protokolleri incelendiğinde yumru parçalarından çok, genç yaprak, yaprak sapı, çiçek tomurcuğu ve çiçek sapı gibi toprak üstü organlar somatik embriyo eldesi için kullanıldığı görülmektedir. Araştırmacılar bu toprak üstü organların eksplant kaynağı olarak kullanılması ile geliştirdikleri somatik embriyo protokollerinin, her siklamen türünde çalıştığını ancak bu türlere ait tüm eksplantlarda somatik embriyo oluşumu elde edilmediğini bildirmişlerdir (Schwenkel ve Winkelmann, 1998, Seyring ve ark., 2009; Tagipur ve ark., 2016). Yumru kullanımı durumunda ise araştırmacılar enfeksiyon nedeni ile aseptik fide yumrularını tercih etmişlerdir (Takamura ve ark., 1995; Karam ve Al-Majathoub, 2000a; Prange ve ark., 2010; Abu-Qaoud, 2004, Yamaner ve Erdağ, 2008). Bununla birlikte gerçekleştirilen pek çok çalışmada aseptik (*in vitro*) koşullarda elde edilmiş olan genç bitki parçalarının (Kreuger ve ar., 1995; Furukawa ve ark., 2002) veya diğer genç bitki organlarının kullanıldığı (Seyring ve ark., 2009; Jalali ve ark., 2010b; Yang ve Zhang, 2010; Tagipur ve ark., 2016) dikkati çekmiştir. Kreuger ve ark., (1995) *C. persicum* ‘Concerto Scarlet Othello’ (S&G Tohum) çeşidine ait yumru parçalarını başlangıç

materyali olarak kullanarak somatik embriyogenesis kültürü kurmuşlardır. Çalışmada yumru parçaları küçüldükçe elde edilen pro-embriyonik kültür oluşumunun teşvik edildiği rapor edilmiştir, ancak araştırmacılar tez çalışmamızdan farklı olarak *in vitro* fidelere ait genç yumru parçaları kullanmışlardır. Tez çalışmasında genotip etkisini minimumda tutabilmek için tek bir yumrudan en fazla sayıda eksplant elde edilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle denemelerde mümkün olduğunca büyük, dolayısı ile yaşlı yumrular kullanılmıştır. Organların yaşlanması ile birlikte bitkinin sahip olduğu endojen hormonlardaki değişimlerin, elde edilen somatik embriyo oranını olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

Somatik embriyo gelişiminin Faz 0 (embriyojenik kallus gelişimi) ve Faz 1 (kallus yapılarının embriyoya dönüşümü) olmak üzere iki aşamadan oluştuğu bilinmektedir. İlk aşamada oksinli ortamda potansiyel hücreler ve hücre kümelerinin oluştuğu, ikinci aşamada ise eksplantın oksinsiz ortama alınarak somatik embriyo yapıları ortaya çıktığı bildirilmektedir (Jimnez, 2001; Winkelmann ve Serek, 2005; Seyring ve ark., 2009; Winkelmann, 2010; Koçak ve ark., 2014; İzgü ve ark., 2016). Ancak bu durum, bizim gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında *C. persicum* türü için geçerli olmamıştır. Çalışma süresince *C. persicum* türünde elde edilen SE yapıları kallus yapılarının elde edildiği BBD içeren ortamda gelişmeye başlamıştır, ayrıca bir farklılaştırma ortamı kullanılmamıştır. Bununla birlikte bu SE yapılarından bir kısmının aynı ortamda çimlenmeye başladığı gözlenmiştir.

4.3.2. *C. graecum* Türüne Ait Bulgular

Çalışma süresince, *C. graecum* türüne ait yumru parçaları kullanılarak çiçeklenme ve dinlenme dönemi olmak üzere iki farklı dönemde *in vitro* rejenerasyon denemeleri kurulmuştur. Denemelerde somatik embriyo yapılarını elde etmek için bitki büyüme düzenleyici olarak besi ortamına ($\frac{1}{2}$ MS), 2,4-D (0, 0.5, 1.0 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹) ve 2iP'nin (0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) farklı kombinasyonları

ilave edilmiştir. Yapılan gözlemlerde, *C. graecum* türünde hiç somatik embriyo gelişimine rastlanılmamış ancak yüksek oksin kullanımına rağmen sürgün oluşumları gözlenmiştir. Bu nedenle ilerleyen denemelere, 2,4-D ve 2 iP'nin yanı sıra deneme değişkenlerine oksin - sitokin oranı 1/3 olacak şekilde IBA ve BA (sırasıyla 0.1 + 0.3, 0.3 + 0.9, 0.5 + 1.5 ve 0.8 + 2.4 mg L⁻¹) dâhil edilmiştir. Denemelerde genel olarak genotipler arası farklılığı ortadan kaldırmak için tüm dozların tek yumru ile kurulmasına dikkat edilmiştir. Ancak gerek yumruların yeterli büyüklükte olmaması, gerekse enfeksiyona bağlı tekerrürler arası heterojen kayıplar nedeni ile her denemede bu sağlanamamıştır. Bununla birlikte, yeterli yumru büyüklüğüne sahip birden çok genotip ile kurulan ve enfeksiyon nedeni ile oluşan kayıpların deneme desenini bozmadığı denemelerde, genotipler arası farklılığı net bir şekilde ortaya koymak mümkün olmuştur. Çalışmada aynı BBD konsantrasyonlarında, hem kök hem de sürgün yapılarının farklı veya aynı eksplantların üzerinde gelişebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle yumrular, kök sürgünlerinin geliştiği alt kısım ve toprak üstü organlarının geliştiği üst kısım olmak üzere yatay ekseninde iki parçaya ayrılmış ve bu parçalar ayrı ayrı kültüre alınarak elde edilen kök ve sürgün oranları arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Kurulan sentetik tohum denemelerinde tez çalışması kapsamında, *C. graecum* türünde SE elde edilemediği için türe ait *in vitro* sürgün uçları kaplanılarak enkapsülasyonun rejenerasyon üzerine olan etkileri incelenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen bitkicikler, yeterli kök oluşumları sağlandıktan sonra başarılı bir şekilde dış ortama aktarılmıştır.

4.3.2.1. *C. graecum* Türüne Ait Birinci Çiçeklenme Dönemi Bulguları

Denemede *C. graecum* türüne ait birden fazla genotip (yumru) kullanılmıştır. Her bir genotipe ait yumru parçaları, 5 eksplant/petri olacak şekilde ve her BBD dozu için 12 ila 15 petri (tekerrür) kullanılarak kültüre alınmışlardır. Bunun yanında, yumrular alt ve üst olmak üzere iki kısma ayrılmış ve bu bölgeler

ayrı ayrı kültüre alınmıştır. Gözlem aşamasında değişkenler 5 petri üzerinden iki farklı genotip olacak şekilde değerlendirmeye alınmışlardır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Genotip ve bölgeler arası farklılık için kullanılan deneme deseni

Genotip 1		Genotip 2	
Her BBD konsantrasyonu için		Her BBD konsantrasyonu için	
Yumrunun alt bölümü	Yumrunun üst bölümü	Yumrunun alt bölümü	Yumrunun üst bölümü
5 eksplant / petri X 5 petri (tekerrür)	5 eksplant / petri X 5 petri (tekerrür)	5 eksplant / petri X 5 petri (tekerrür)	5 eksplant / petri X 5 petri (tekerrür)

Tekerrür miktarının 5'den fazla olduğu durumlarda ise hiç rejenerasyon gözlenmeyen petriler değerlendirme dışında tutulmuş ve istatistiki analizler 5 tekerrür üzerinden yapılmıştır. Bu şekilde genotipler arası rejenerasyon farklılıkları kendi içinde, yumruların alt ve üst bölgeleri arasında oluşan rejenerasyon farklılıkları da kendi içinde istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.13'de bölgeler arasındaki farklılıklar, Çizelge 4.14'de ise genotipler arasındaki farklılıklar yer almaktadır. BBD*Eksplantın Alındığı Bölge (Ek 3) interaksyonu ile BBD*Genotip (Ek 4) interaksyonlarının yer aldığı tablolara Ek bölümünde yer verilmiştir.

Çizelge 4.13. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait alt ve üst yumru bölgelerine ilişkin rejenerasyon oranları

Eksplantın alındığı bölge	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
	Alt	Üst	Toplam Bölge	Alt	Üst	Toplam Bölge
Toplam BBD dozu	60.75 (54.3)	63.25 (55.58)	62 (54.94)	3.92 (4.18)	5.5 (5.86)	4.71 (5.02)
Eksplantın alındığı bölge	Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Alt	Üst	Toplam Bölge	Alt	Üst	Toplam Bölge
Toplam Bölge	37.75 (35.59)	40.25 (36.51)	39 (36.05)	2.25 (2.64)	3 (3.46)	2.625 (3.05)

Bölgeler arasındaki farklılıklar; LSD_{Kallus} =Ö.D.; LSD_{Sürgün} =Ö.D.; LSD_{Kök} =Ö.D.; LSD_{Bitkicik} =Ö.D. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Yumruların alt ve üst olmak üzere ikiye bölünerek kültüre alınması sonucunda bölgeler arasında meydana gelen rejenerasyon farklılıkları, istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Deneme genelinde elde edilen sürgün ve kök oluşumlarına ilişkin rejenerasyon oranları incelendiğinde, denemede kullanılan genotiplerin daha çok kök oluşturma eğiliminde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşturma oranı, deneme genelinde % 4.71 iken, kök rejenerasyonu % 39 olarak gözlenmiştir. Sürgün oranının düşük olması, direkt olarak elde edilen bitkicik oranının da düşük olması ile sonuçlanmıştır. Deneme genelinde kullanılan eksplantlardan yalnızca % 2,6 oranında bitkicik elde edilebilmiştir.

Çizelge 4.14. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları

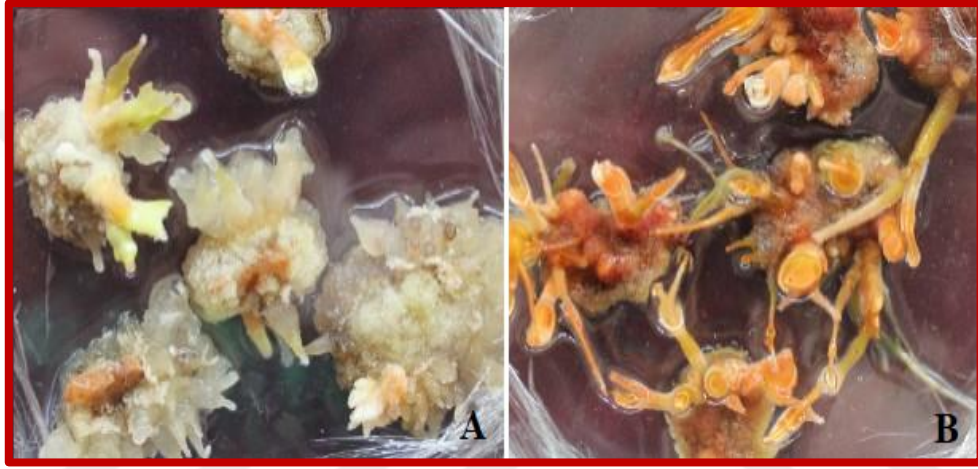
Genotip	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	79.75 a (70.54)	44.25 b (39.34)	62 (54.94)	9.42 a (9.87)	0 b (0)	4.71 (4.93)
Genotip	Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	38.5 (37.1)	39.5 (35.35)	39 (36.22)	5.25 a (5.44)	0 b (0)	2.625 (3.05)

Genotipler arasındaki farklılıklar; ***LSD Kallus=7.982; ***LSD Sürgün=3.046; LSD Kök=Ö.D.; ***LSD Bitkicik=2.560; (***)p<0.001 düzeyinde önemli).

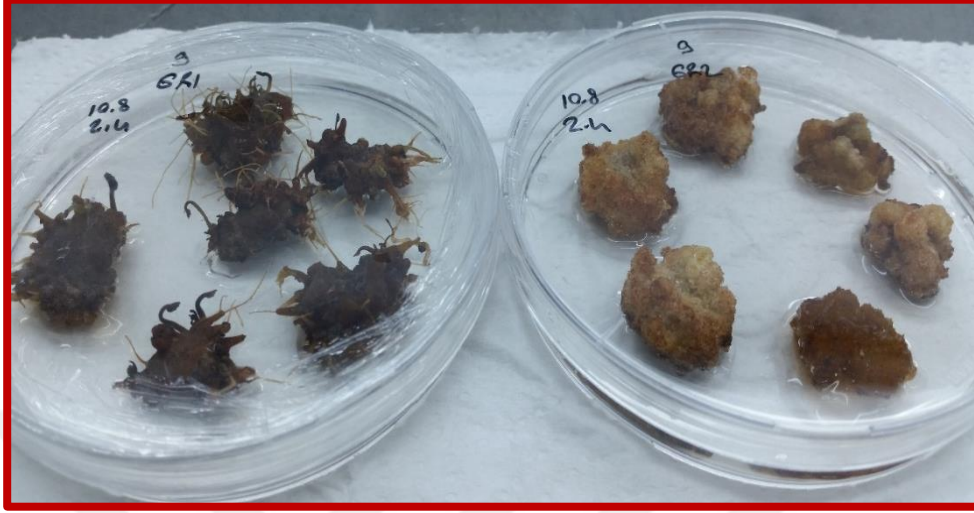
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Genotiplerin rejenerasyon yetenekleri incelendiğinde, 1 no'lu genotipin kallus ve sürgün oluşturma bakımından rejenerasyon yeteneğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Genotip 1'de % 79.75 olarak gözlenen kallus oluşum oranının, Genotip 2'de % 44.25 olduğu görülmüştür. Genotip 1'de, % 9.42 oranında sürgün oluşumu gözlenirken, bunun aksine 2 no'lu genotipte sürgün oluşumu gözlenmemiş ve sonuç olarak bu genotipten bitkicik elde edilememiştir. Genotip farklılığının kök

rejenerasyonu üzerine olan etkisi ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte genotipler arasında oluşan kallusların yapı ve renk olarak farklılık gösterdiği ve benzer olarak kök yapılarının da farklı oldukları görülmüştür (Şekil 4.12). Benzer şekilde, Genotip 1'in kök ve sürgün rejenerasyonu olarak cevap verdiği dozlarda Genotip 2'de yalnızca kallus yapılarının oluştuğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. İlk yıl çiçeklenme döneminde kültüre alınan iki farklı *C. graecum* genotipinde aynı BBD dozlarında gözlenen farklılıklar A) Sarı - açık kahverengi tonlarında dağınık kallus yapısı, yeşil renkli kök benzeri yapılar, B) Koyu kahverengi kompakt yapılı kallus, diğer genotipe nazaran daha uzun yapıda, açık kahverengi kök benzeri yapılar



Şekil 4.13. Aynı BBD dozuna farklı tepkiler gösteren iki farklı *C. graecum* genotipi. Sol tarafta yer alan Genotip 1'e ait eksplantların tamamında kök ve sürgün yapısı gelişirken, sağ taraftaki Genotip 2'ye ait eksplantlardan, tüm BBD konsantrasyonlarında, yalnızca kallus yapıları elde edilebilmiştir

Deneme genelinde, genotip ve bölgelerin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen BBD dozlarının, rejenerasyon üzerine olan etkilerine Çizelge 4.15'de yer verilmiştir.

Çizelge 4.15. Birinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oranı %	Sürgün oranı %	Kök oranı %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.5 + 0.1	42 (37.15)	0 c (0)	14 fg (14.31)	0 c (0.00)
0.5 + 0.3	46 (43.96)	3.33 bc (4.82)	20 efg (22.39)	0 c (0.00)
0.5 + 0.5	84 (73.03)	4 bc (5.31)	44 bcde (40.03)	2 bc (2.65)
0.5 + 0.8	72 (62.76)	4 bc (5.31)	56 abc (48.57)	2 bc (2.65)
1 + 0.1	66 (58.96)	0 c (0)	10 g (11.89)	0 c (0.00)
1 + 0.3	48 (42.34)	10 bc (9.00)	30 cdefg (28.50)	4 bc (3.92)
1 + 0.5	70 (64.51)	0 c (0)	26 defg (24.46)	0 c (0.00)
1 + 0.8	44 (38.53)	2 c (2.65)	70 a (64.50)	2 bc (2.65)
1.5 + 0.1	74 (65.53)	0 c (0)	20 efg (23.78)	0 c (0.00)
1.5 + 0.3	46 (39.57)	2 c (2.65)	24 efg (23.31)	2 bc (2.65)
1.5 + 0.5	62 (55.26)	16 ab (14.07)	50 abc (46.50)	8 b (9.23)
1.5 + 0.8	68 (58.95)	6 bc (7.96)	66 ab (56.29)	4 bc (5.31)
2 + 0.1	64 (57.81)	24 a (23.20)	36 cdefg (30.68)	16 a (17.08)
2 + 0.3	68 (58.84)	4 bc (5.31)	46 bcde (39.68)	2 bc (2.65)
2 + 0.5	64 (56.42)	0 c (0)	38 bcdef (36.34)	0 c (0.00)
2 + 0.8	74 (65.42)	0 c (0)	74 a (65.42)	0 c (0.00)
Toplam BBD	62 (54.94)	4.71 (5.02)	39 (36.05)	2.63 (3.05)

LSD_{Kallus}=Ö.D.; ***LSD_{Sürgün}=2.621; ***LSD_{Kök}=22.468; ***LSD_{Bitkicik}=7.578;

(***p<0.001 düzeyinde önemli); Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Buna göre farklı BBD dozlarının kallus oluşumu üzerine olan etkisi istatistiki olarak önemli bulunmazken, deneme genelinde % 62 oranında kallus elde edilmiş ancak hiçbir dozda *C. persicum* türünde gözlenen % 100 kallus oranına ulaşamamıştır. Benzer şekilde, gözlemlenen sürgün, kök ve elde edilen bitkicik oranlarının da, *C. persicum* türünün altında oldukları görülmüştür. Deneme genelinde % 24 ile en yüksek sürgün oluşum oranı, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ 2iP içeren ortamdan elde edilmiştir. Buna paralel olarak en yüksek bitkicik oluşumu da, % 16 ile aynı BBD konsantrasyonundan elde edilmiştir. Dillen ve ark., (1996) çalışmalarında açık renkli sarımtırak kallusların koyu kahverengi olanlara nazaran daha yüksek organojenik potansiyele sahip olduklarını belirtmiştir. Ancak tez çalışmamızda genotip etkisi daha ön plana çıkmıştır. Genotip 2'den elde edilen

kallus yapılarının tamamı açık renkli ve kısmen dağınık yapıya sahipken üzerlerinde hiçbir BBD konsantrasyonunda sürgün gelişimi gözlenmemiştir.

4.3.2.2. *C. graecum* Türüne Ait Birinci Dinlenme Dönemi Bulguları

Dinlenme dönemine ilişkin denemeler diğer türlerle birlikte sulama işlemine ara verilip, bitkilerin toprak üstü organları tamamen kuruduktan sonra kurulmuştur. Denemede, birden çok *C. graecum* yumrusu (genotip) kullanılmıştır. Daha önceden kurulmuş olan denemelerde uygulanan yumruların alt ve üst olmak üzere iki parça halinde kültüre alınması işlemine, bu denemede de aynı deneme deseni uygulanarak devam edilmiştir (Çizelge 4.12). Denemede genotiplerin aynı BBD dozlarına göstermiş olduğu farklı tepkiler ile yumruların alt ve üst bölgeleri arasında oluşan rejenerasyon farklılıkları, istatistiki analizlerle ortaya konulmuştur. Çizelge 4.16'da bölgeler arasında farklılıklar, Çizelge 4.17'de de genotipler arasında farklılıklar görülmektedir. Denemeye ilişkin BBD*Eksplantın Alındığı Bölge interaksyonu (Ek 5) ile BBD*Genotip interaksyonlarının (Ek 6) bulunduğu detaylı tablolar Ek bölümünde yer almaktadır.

Çizelge 4.16. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait alt ve üst yumru bölgelerine ilişkin rejenerasyon oranları

Eksplantın Alındığı Bölge	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
	Alt	Üst	Toplam Bölge	Alt	Üst	Toplam Bölge
Toplam BBD Dozu	94.5 (84.83)	92.25 (82.55)	93.38 (83.7)	29.75 (26.49)	27 (24.79)	28.38 (25.64)
Eksplantın Alındığı Bölge	Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Alt	Üst	Toplam Bölge	Alt	Üst	Toplam Bölge
Toplam BBD Dozu	39.25 (35.55)	35 (31.67)	37.13 (33.61)	26.5 (23.98)	23.75 (20.82)	25.13 (22.41)

Bölgeler arasındaki farklılıklar; LSD_{Kallus} = Ö.D.; LSD_{Sürgün} = Ö.D.; LSD_{Kök} = Ö.D.; LSD_{Bitkicik} = Ö.D.; Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Buna göre yumruların alt ve üst olmak üzere iki farklı bölgeye ayrılarak kültüre alınması durumunda, bölgeler arasında meydana gelen rejenerasyon farklılığı istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.17. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları

Genotip	Kallus oranı %			Sürgün oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	98,75 a (88,34)	88 b (79,05)	93,38 (83,70)	52.25 a (46.36)	4.5 b (4.92)	28.38 (25.64)
Genotip	Kök oranı %			Elde edilen bitkicik oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	62 a (55.39)	12.25 b (11.83)	37.13 (33.61)	48.25 a (42.86)	2 b (1.94)	25.13 (22.41)

Genotipler arası farklılıklar; ***LSD_{Kallus}=3.881; ***LSD_{Sürgün}=5.123; ***LSD_{Kök}=6.644; ***LSD_{Bitkicik}=6.073; (***)p<0.001 düzeyinde önemli; Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Denemede kullanılan genotiplerin rejenerasyon yetenekleri karşılaştırıldığında ise, Genotip 1'in BBD dozlarına daha yüksek oranda cevap verdiği görülmektedir. Gözlemler sonucu elde edilen verilere göre genotipler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak p<0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kallus oluşturma yetenekleri incelendiğinde, aradaki farklılık yalnızca % 10 düzeylerindeyken, Genotip 1'de elde edilen kök, sürgün ve dolayısıyla elde edilen bitkicik oranları Genotip 2'den oldukça yüksek bulunmuştur.

Toplam kallus oluşum oranının % 93.38 olduğu denemede, toplam 7 farklı BBD dozunda % 100 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.18). Deneme

genelinde, BBD dozları toplamında % 28.38 oranında sürgün ve % 37.13 oranında kök rejenerasyonu gözlenirken, % 25.13 oranında bitkicik elde edilmiştir.

Çizelge 4.18. İlk yıl dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %	Sürgün Oranı %	Kök Oranı %	Elde Edilen Bitkicik Oranı %
0.5 + 0.1	92 abc (79.37)	2 g (2.656)	2 f (2.66)	2 e (2.65)
0.5 + 0.3	100 a (90.00)	52 a (46.26)	30 cde (29.89)	30 b (28.39)
0.5 + 0.5	100 a (90.00)	46 abc (41.07)	20 def (19.50)	32 b (26.87)
0.5 + 0.8	98 a (87.34)	34 bcde (29.42)	16 ef (16.96)	32 b (26.76)
1 + 0.1	100 a (90.00)	14 efg (15.81)	44 abc (39.92)	2 e (2.65)
1 + 0.3	50 c (45.00)	6 fg (6.579)	16 ef (15.57)	4 de (3.92)
1 + 0.5	84 bc (75.92)	26 de (23.19)	38 bcde (33.45)	24 bc (21.92)
1 + 0.8	98 a (87.34)	36 bcd (30.68)	48 abc (42.34)	40 ab (36.00)
1.5 + 0.1	96 ab (86.08)	14 efg (15.81)	40 abcd (36.00)	4 cde (5.31)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	50 ab (43.49)	52 abc (46.15)	58 a (51.34)
1.5 + 0.5	100 a (90.00)	32 cde (26)	44 abcd (37.03)	22 bcde (19.26)
1.5 + 0.8	100 a (90.00)	30 cde (27)	60 a (54.00)	38 b (33.34)
2 + 0.1	98 a (87.34)	26 de (24.57)	40 abcd (36.00)	22 bcd (20.76)
2 + 0.3	96 ab (86.08)	22 def (20.65)	52 abc (47.65)	30 b (25.49)
2 + 0.5	82 c (74.66)	34 bcd (30.81)	34 cde (29.42)	26 b (23.07)
2 + 0.8	100 a (90.00)	30 de (25.49)	58 ab (51.23)	36 b (30.68)
Toplam BBD	93.38 (83.70)	28.38 (25.64)	37.13 (33.61)	25.13 (22.41)

***LSD_{Kallus}=10.977; ***LSD_{Sürgün}=14.490; ***LSD_{Kök}=18.793; ***LSD

Bitkicik=17.177; (***)p<0.001 düzeyinde önemli);

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

4.3.2.3. *C. graecum* Türüne Ait İkinci Çiçeklenme Dönemi Bulguları

Tez çalışması kapsamında, ilk yıl kurulmuş olan denemeler bazı değişiklikler yapılarak ikinci yıl tekrar edilmiştir. İlk yıl denemelerinde, yumruların alt ve üst olmak üzere iki bölgeye ayrılarak kültüre alınması işlemi ile bölgeler arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu nedenle ilerleyen denemelerde bu uygulamaya devam edilmemiştir. *C. graecum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme dönemi denemeleri, aynı dönemde çiçeklenen *C. cilicium* türü ile birlikte sonbahar döneminde kurulmuştur. Birden fazla genotipin kullanıldığı denemede, yumruların yeterli büyüklükte olması ve enfeksiyon kayıplarının deneme desenini aksatmayacak düzeylerde görülmesi, denemede genotipler arasındaki rejenerasyon farklılığını gözlemlemeye imkân vermiştir. Genotipler arası farklılık (Çizelge 4.19) ile BBD dozlarının rejenerasyon üzerine olan etkileri (Çizelge 4.20), bu bölümde belirtilirken, BBD*Genotip interaksiyonunun yer aldığı detaylı tabloya Ek bölümünde Ek 7 başlığı altında yer verilmiştir.

Çizelge 4.19. İkinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları

Genotip	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	81.04 b (72.08)	88.54 a (78.12)	84.79 (75.11)	3.88 b (4.71)	15.79 a (15.09)	9.84 (9.9)
Genotip	Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	14.35 b (13.48)	52.83 a (47.44)	33.59 (30.46)	1.46 b (1.96)	8.98 a (9.67)	5.22 (5.82)

Genotipler arası farklılıklar; *LSD_{Kallus}=5.724; ***LSD_{Sürgün}=3.720; ***LSD_{Kök}=7.046; ***LSD_{Bitkicik}=3.306; (*p<0.5; ***p<0.001 düzeyinde önemli)
Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Denemede genotipler arasında gözlenen kallus oranları arasındaki farklılık, istatistiki olarak $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunurken, sürgün, kök ve elde edilen bitkicik oranları arasındaki farklılıklar, $p < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Deneme genelinde, % 84.79 oranında kallus, % 9.84 oranında sürgün, % 33.59 oranında kök ve % 5.22 oranında bitkicik elde edildiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.20. İkinci çiçeklenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyon oranları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %	Sürgün Oranı %	Kök Oranı %	Elde Edilen Bitkicik Oranı %
0.5 + 0.1	70 ef (61.49)	0 d (0.00)	6 g (6.57)	0 c (0.00)
0.5 + 0.3	82bcde(71.76)	0 d (0.00)	18 defg (18.23)	0 c (0.00)
0.5 + 0.5	84bcde(73.03)	0 d (0.00)	16 efg (16.96)	0 c (0.00)
0.5 + 0.8	78 cde (69.34)	0 d (0.00)	16 efg (16.96)	0 c (0.00)
1 + 0.1	94.67 abcd (83.81)	0 d (0.00)	3.66 g (5.06)	0 c (0.00)
1 + 0.3	96 ab (86.07)	2 d (2.65)	16 fg (15.57)	0 c (0.00)
1 + 0.5	94 abcd (83.42)	4 d (5.31)	38 bcdef (33.45)	4 bc (5.31)
1 + 0.8	96 abc (84.68)	18 bc (16.84)	48 abc (42.34)	10 ab (10.50)
1.5 + 0.1	58.33 f (51.59)	9.67 cd (10.25)	36.33 cdef (32.43)	7.67 abc (8.99)
1.5 + 0.3	70 ef (61.49)	30 a (29.78)	46 abc (38.18)	16 a (17.08)
1.5 + 0.5	69.67 ef (61.46)	24.67 ab (25.17)	42 abcd (37.26)	13.33 ab (13.91)
1.5 + 0.8	76 de (68.07)	18 bc (16.84)	60 a (54.00)	8 ab (10.62)
2 + 0.1	94 abcd (83.42)	0 d (0.00)	40 abcde (36.00)	0 c (0.00)
2 + 0.3	96 abc (84.68)	0 d (0.00)	46 abc (42.46)	0 c (0.00)
2 + 0.5	100 a (90.00)	29 a (29.31)	45.5 abc (39.34)	12.5 ab (13.50)
2 + 0.8	98 ab (87.34)	22 ab (22.27)	60 ab (52.49)	12 ab (13.15)
Toplam BBD	84.79 (75.11)	9.84 (9.9)	33.59 (30.462534)	5.22 (5.82)

LSD Kallus=16.192; ***LSD Sürgün=16.196; ***LSD Kök=19.928; ***LSD Bitkicik=9.351; () $p < 0.001$ düzeyinde önemli)

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Denemede, yalnızca 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP içeren besi ortamında % 100 oranında kallus oluştuğu gözlenmiştir. Deneme genelinde, % 33.59 olan kök rejenerasyon oranı, 1.5 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP ilave edilmiş olan besi ortamında % 60 ile en yüksek seviyede tespit edilmiştir. En yüksek sürgün oluşumu, % 30 ile 1.5 mg L^{-1} 2,4-D + 0.3 mg L^{-1} 2iP ilave edilen besi ortamından elde edilmiştir. Buna paralel olarak en yüksek bitkicik oranının da, aynı BBD dozundan elde edildiği görülmüştür.

Bununla birlikte denemede, gözlem aşamasından çok daha sonra, yaklaşık bir yıllık alt kültür aşamasında, kararmakta olan bazı kallus yapılarından yeni sürgün yapılarının gelişmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *C. graecum* türünde bir yıllık alt kültür sonrasında, kararmakta olan kallus yapıları üzerinde oluşmaya başlayan organojenik yapılar. (A) Aynı eksplant üzerinde hem sürgün hem kök benzeri yapı oluşumu (B) Gelişmeye başlayan yaprak sürgünleri (C) Belirginleşen yapraklar

4.3.2.4. *C. graecum* Türüne Ait İkinci Dinlenme Dönemi Bulguları

C. graecum türüne ait ikinci yıl dinlenme dönemi denemesi, diğer tüm türlerle birlikte, toprak üstü organların tamamen kuruyup yumruların dinlenmeye girmesinden sonra kurulmuştur. İki farklı genotipe ait verilerin elde edildiği denemede, 2,4-D ve 2iP'nin yanı sıra IBA ve BA ilave edilen ortamların rejenerasyon üzerine olan etkileri de gözlenmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. İkinci dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türünde farklı BBD dozlarında elde edilen rejenerasyona oranları

BBD mg L ⁻¹ (2,4-D+2iP)	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.5 + 0.1	98.33 a (87.59)	35 bcde (31.34)	44.76 abcd (43.29)	15.23 cde (19.24)
0.5 + 0.3	95 a (85.5)	16.66 efg (15.9)	45 bcde (39.06)	8.33 e (10.75)
0.5 + 0.5	100 a (90)	38.33 abc (35.02)	28.33 ef (26.02)	20 bcd (23.74)
0.5 + 0.8	100 a (90)	24.1 cdef (23.39)	12.38 f (13.25)	16.6 de (18.73)
1 + 0.1	100 a (90)	41.66 abc (38.55)	39.04 bcde (38.27)	14.52 de (18.8)
1 + 0.3	98.75 a (87.93)	32.91 abcd (33.05)	57.91 ab (52.54)	19.58 bcd (24.69)
1 + 0.5	100 a (90)	45 ab (42.22)	29.52 def (28.14)	30 ab (31.73)
1 + 0.8	100 a (90)	43.57 ab (41.11)	37.14 bcde (37.33)	22.85 abcd (25.45)
1.5 + 0.1	100 a (90)	43.21 abc (36.47)	49.28 abc (44.58)	26.36 bcd (24.89)
1.5 + 0.3	100 a (90)	46.78 ab (43.08)	70.05 a (57.15)	28.86 abcd (27.68)
1.5 + 0.5	100 a (90)	46.96 ab (44.41)	54.22 abc(46.05)	24.1 abcd (26.31)
1.5 + 0.8	100 a (90)	41.19 abc (38.25)	66.66 a (56.88)	27.85 abcd (27.16)
2 + 0.1	100 a (90)	55.95 a (50.06)	61.23 a (56.03)	26.19 abc (29.2)
2 + 0.3	98.75 a (87.93)	47.2 ab (42.04)	62.44 a (57.23)	23.69 abcd (26.33)
2 + 0.5	99.07 a (88.37)	41.95 ab (41.18)	56.53 abc (49.51)	34.66 a (35.55)
2 + 0.8	100 a (90)	30.41 bcde (31.12)	39.58 cde (35.89)	23.75 abcd (25.79)
BBD mg L ⁻¹ (IBA + BA)	Kallus oluşumu %	Sürgün oluşumu %	Kök oluşumu %	Elde edilen bitkicik oranı %
0.1 + 0.3	66.66 b (56.88)	26.66 bcde(27.92)	0 f (0)	0 f (0)
0.3 + 0.9	76.66 b (65.74)	16.66 def(17.48)	0 f (0)	0 f (0)
0.5 + 1.5	60 b (54.14)	8.333 efg (8.03)	0 f (0)	0 f (0)
0.8 + 2.4	46.66 c (41.47)	0 g (0)	0 f (0)	0 f (0)
1.0 + 3.0	18.33 d (19.75)	0 g (0)	0 f (0)	0 f (0)
Toplam	88.49 (79.31)	32.5 (30.51)	35.91 (32.44)	17.27 (18.86)

LSD_{Kallus}=12.136; ***LSD_{Sürgün}=17.046; ***LSD_{Kök}=15.536; ***LSD_{Bitkicik}=10.238; ()p<0.001 düzeyinde önemli).

Sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Deneme % 88.49 oranında kallus oluşumu gözlenirken, 11 farklı BBD konsantrasyonunda % 100 oranında kallus geliştiği görülmüştür. Toplam %32.05 olarak gözlenen sürgün oluşturma oranı, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ 2iP ilave edilmiş besi ortamında % 55.95 ile en yüksek oranda gözlenmiştir. Elde edilen bitkicik oranları incelendiğinde, en yüksek oranın 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP ilave edilmiş olan besi ortamından % 34.66 olarak gözlendiği görülmüştür. Diğer denemelerde en yüksek bitkicik oranı, en yüksek sürgün gelişimi gösteren BBD dozundan elde edilmişken, bu denemede farklı olarak en yüksek sürgün ve bitkicik oranları farklı BBD dozlarında gözlenmiştir.

Çizelge 4.22. İkinci dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türüne ait genotipler arası rejenerasyon farklılıkları

Genotip	Kallus oluşumu %			Sürgün oluşumu %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	89.12 (79.69)	87.86 (78.92)	88.49 (79.31)	47 a (41.97)	18 b (19.05)	32.5 (30.51)
Genotip	Kök oluşumu %			Elde edilen bitkicik oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı	Genotip 1	Genotip 2	Genotipler toplamı
Toplam BBD Dozu	41.14 a (36.95)	30.68 b (27.94)	35.91 (32.44)	23.05 a (23.67)	11.49 b (14.06)	17.27 (18.86)

Genotipler arasındaki farklılıklar; LSD_{Kallus}= Ö.D.; ***LSD_{Sürgün}=5.266; ***LSD_{Kök}=4.799; ***LSD_{Bitkicik}=3.163; (***)p<0.001 düzeyinde önemli);

Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Genotipler arası rejenerasyon farklılıkları incelendiğinde, kallus oluşum oranı bakımından genotipler arasında istatistiki olarak bir farklılık olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, genotipler arasındaki sürgün ve kök rejenerasyonu ile

elde edilen bitkicik oranları arasındaki farklılıklar, istatistiki olarak $p < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

4.3.2. 5. *C. graecum* Türüne Ait Dönem Farklılıkları

C. graecum türüne ait yumru parçalarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada, elde edilmiş olan veriler son olarak çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıklarını karşılaştırmak için kullanılmıştır. İlk yıl ve ikinci yıl verileri kendi içlerinde ayrı olarak değerlendirmeye alınmıştır. Sonuçlar, denemeler genelinde elde edilmiş olan toplam rejenerasyon oranları (BBD toplamları) olarak bu bölümde sunulurken, BBD*Alındığı Dönem interaksiyonlarının yer aldığı detaylı çizelgelere Ek bölümünde Ek 9 (İlk yıl) ve Ek 10 (İkinci yıl) başlıkları altında yer verilmiştir.

Çizelge 4.23. *C. graecum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

Kallus oluşum oranı %			Sürgün oluşum oranı %		
Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
93.38 a (83.69)	62.00 b (54.94)	77.69 (69.32)	28.38 a (25.64)	4.71 b (5.01)	16.55 (15.33)
Kök oluşum oranı %			Bitkiciğe dönüşüm oranı %		
Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
37.13 (33.61)	39.01 (36.05)	38.07 (34.83)	25.13 a (22.40)	2.63 b (3.05)	13.88 (12.73)

Dönemler arasındaki farklılıklar; ***LSD_{Kallus}=5.460; ***LSD_{Sürgün}=4.760; LSD_{Kök}=Ö.D.; LSD_{Bitkicik}=4.991; (***) $p < 0.001$ düzeyinde önemli; Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

Buna göre ilk yıl kurulmuş olan denemelerde kök oluşum oranları bakımından dönemler arasında gözlenen farklılık, istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte, dinlenme döneminde elde edilmiş olan kallus, sürgün ve bitkicik oranlarının ($p < 0.001$ önem düzeyinde) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde edilmiş olan bulgular, *C. persicum* türüne ilişkin ilk yıl bulguları ile karşılaştırıldığında (Çizelge 4.10), *C. persicum* türünde de kök rejenerasyon

oranları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmazken, genel olarak yumru eksplantlarına ait rejenerasyon yeteneklerinin dinlenme döneminde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

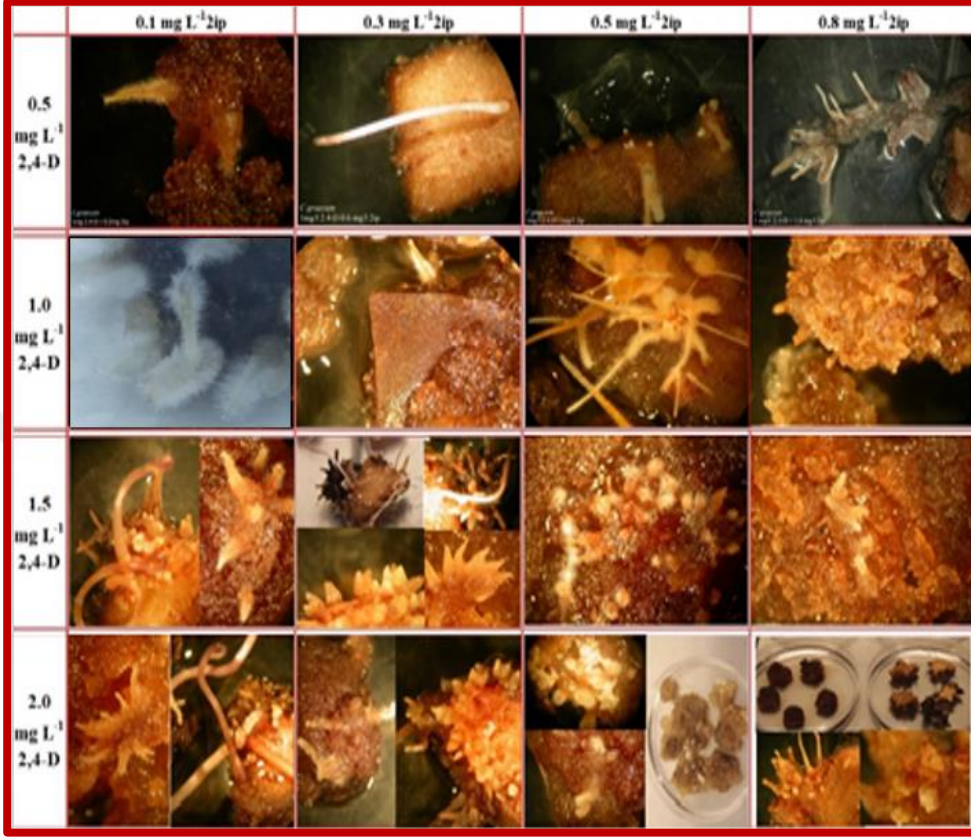
Çizelge 4.24. *C. graecum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

kallus oluşum oranı %			Sürgün oluşum oranı %		
Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
99.36 a (89.18)	84.79 b (75.10)	92.08 (82.15)	39.61 a (36.83)	9.83 b (9.90)	24.72 (23.37)
Kök oluşum oranı %			Bitkiciğe dönüşüm oranı %		
Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
47.41 a (42.81)	33.59 b (30.46)	40.50 (36.63)	22.83 a (24.86)	5.22 b (5.81)	14.03 (15.34)

Dönemler arasındaki farklılıklar; ***LSD_{Kallus}=2.915; ***LSD_{Sürgün}=4.718; ***LSD_{Kök}=6.018; LSD_{Bitkicik}=3.640; (***)p<0.001 düzeyinde önemli);

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.

İlk yıl elde edilmiş olan *C. graecum* ve *C.persicum* türleri verilerine paralel olarak ikinci yıl denemelerinde de yumru eksplantlarının ekzogen BBD uygulamalarına verdiği rejenerasyon tepkisi, oransal olarak daha yüksek bulunmuştur. Veriler incelendiğinde, dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* yumrularının, *C. persicum* türünde de tespit edildiği gibi, daha yüksek bir *in vitro* rejenerasyon yeteneğine sahip oldukları görülmektedir.



Şekil 4.15. Farklı *C. graecum* yumrularının rejenerasyon tepkilerine örnekler

C. graecum türü ile kurulmuş olan denemeler genel olarak değerlendirildiğinde, *C. persicum* türünde karşılaşıldığı gibi pek çok eksplant üzerinde hem yaprak sürgünü hem de kök yapılarının bir arada geliştiği görülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Dinlenme döneminde kültüre alınan *C. graecum* türünde, aynı eksplant üzerinde gözlenen kök ve sürgün gelişimi ile kök yapılarından gelişmeye devam eden kallus yapıları

Tez çalışması süresince *C. graecum* türünde SE elde edilememiştir. Ancak Prange ve ark., (2010) *C. graecum* türüne ait yaprak dokularından 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.8 mg L^{-1} 2iP kullanarak SE elde ettiklerini bildirmektedir. Benzer şekilde Furukawa ve ark., 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} KİN ilave ettikleri ortamda *C. graecum* türünde SE elde etmişlerdir. Çalışmamızda SE elde edilememesinin büyük ölçüde denemelerde kullanılan genotiplerin SE potansiyeline sahip olamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kullanılan eksplant kaynağının SE oluşumunu etkilediği bilinmektedir (Schwenkel ve Winkelmann, 1998, Seyring ve ark., 2009; Tagipur ve ark., 2016). Benzer durum organogenesis için de geçerlidir. Abu-Qaoud (2004) yaprak sapı eksplantından hiç organ oluşumu elde edemezken en

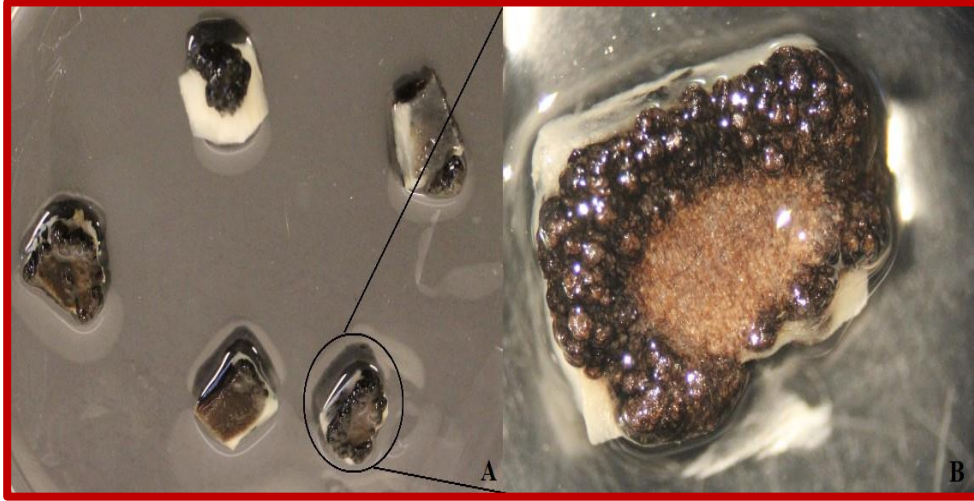
yüksek sürgün oranını *in vitro* yumru eksplantından elde ettiğini bildirmiştir. Yamaner ve Erdağ (2008) ise *C. mirabile* türüne ait tüm bitki organları arasında yalnızca *in vitro* yumru parçalarından organojenik yapılar elde edebilmişlerdir. Çalışmamızda, *C. persicum* türünde elde edilen SE oranının da çok düşük olduğu göz önüne alındığında bu durumun eksplant kaynağından ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Bunun yanında Geier (1977) BBD konsantrasyonları üzerinde değişiklik yaparak organ oluşumunu maniple edebildiğini bildirmiştir. Araştırmacı, 0.1 - 0.5 mg L⁻¹ aralığında 2,4-D uygulaması ile yumru elde ederken bu konsantrasyon 2.5 mg L⁻¹'e çıktığında yalnızca kök oluştuğunu rapor etmiştir. Ancak bizim çalışmamızda ise organ oluşumu üzerine genotipin daha etkili olduğu ve 0.5 mg L⁻¹ konsantrasyonunda bile kök yapılarının oluştuğu gözlenmiştir. Prange ve ark., (2008) ise *C. graecum* türünde 1 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ NAA kullanımı ile % 44 oranında sürgün elde ettiklerini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise oksin/sitokinin oranı düşük olduğu durumda en fazla (0.1 mg L⁻¹ IBA + 0.3 mg L⁻¹ BA) % 27 oranında sürgün elde edilebilmiştir. Sürgün oluşumunun, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ 2iP kullanımında ise % 56'ya kadar çıkabildiği gözlenmiştir (2. Yıl dinlenme dönemi).

4.3.3. *C. coum* Türüne Ait Bulgular

Tez çalışması kapsamında, *C. coum* türüne ait yumru eksplantları kullanılarak iki yıl dinlenme ve iki yıl çiçeklenme dönemi olmak üzere toplam 4 farklı *in vitro* rejenerasyon denemesi kurulmuştur. Bu denemelerde embriyojenik ve organojenik yapılar elde etmek için besi ortamlarına 2,4-D (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg L⁻¹) ve 2iP (0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mg L⁻¹) ile IBA (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mg L⁻¹) ve BA'nın (0.3, 0.9, 1.5, 2.4, 3.0 mg L⁻¹) farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları ilave edilmiştir.

Daha önce rejenerasyon bulguları sunulmuş olan *C. graecum* ve *C. persicum* türünden farklı olarak, *C. coum* türünde elde edilmiş olan sonuçların bu iki türün oldukça altında olduğu gözlenmiştir. *C. coum* türünde gözlenen kallus gelişimlerinin, diğer iki türe nazaran, daha düşük ve kallus kütlesi olarak (en fazla 5 mm çapında) daha küçük olduğu görülmüştür. Elde edilen kallusların tamamına yakını siyah ve sert yapıda olup, ilerleyen alt kültürlerde ölmüşlerdir (Şekil 4.17). Bunun yanında tez çalışması süresince kurulmuş olan denemelerde, sürgün veya kök benzeri her hangi bir organojenik yapının gelişimine rastlanılmamıştır. Bu nedenle gözlemlerde elde edilmiş olan kallus rejenerasyonuna ilişkin veriler, BBD konsantrasyonu ve dönem bilgilerini içeren tek bir çizelge halinde sunulmuştur. Değerlendirme aşamasında, 2,4-D + 2iP ile IBA + BA içeren ortamlar bir arada ele alınmıştır.



Şekil 4.17. *C. coum* türünde gözlenen siyah renkli kompakt kallus yapıları A) Aynı petrideki eksplantların bir arada görünümü, B) Kallus yapısının yakından görünümü

Çizelge 4.25. *C. coum* türünde çalışma süresince elde edilmiş olan kallus oranları

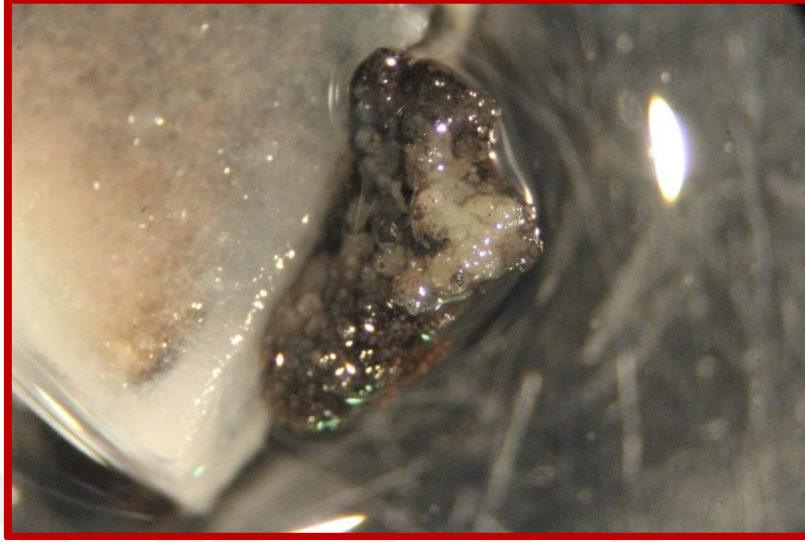
BBD mg L ⁻¹ (2,4-D + 2iP)	İlk yıl dinlenme dönemi	İlk yıl çiçeklenme dönemi	İkinci yıl dinlenme dönemi	İkinci yıl çiçeklenme dönemi
0.5 + 0.1	0 f (0)	0 f (0)	0 d (0)	0 d (0)
0.5 + 0.3	35.6 b (36.46)	0 f (0)	0 d (0)	0 d (0)
0.5 + 0.5	0 f (0)	0 f (0)	0 d (0)	0 d (0)
0.5 + 0.8	0 f (0)	15.4bcde(19.79)	11.6 cd (12.92)	8 cd (10.62)
1 + 0.1	19.2 cd (20.4)	14.8bcde(17.55)	6.4 cd (9.36)	4 cd (5.31)
1 + 0.3	11.6 de (15.64)	21.6 bcd (24.71)	0 d (0)	0 d (0)
1 + 0.5	12 de (15.93)	11.6bcdef(15.64)	20 bc (23.78)	11.2 bcd(15.35)
1 + 0.8	8 def (10.62)	4 ef (5.31)	7.2 cd (10.04)	4 cd (5.31)
1.5 + 0.1	17.6 cde (19.27)	14.4 cdef (14.74)	14 cd (17.27)	12.4 bcd (16.06)
1.5 + 0.3	35.2 b (36.09)	20 bcd (26.56)	28 bc (28.98)	22 bc (21.68)
1.5 + 0.5	34 b (35.61)	8 def (10.62)	16 bcd (21.25)	8 cd (10.62)
1.5 + 0.8	35.2 bc (32.9)	21.2 bcd (21.82)	28 bc (28.62)	18 bc (19.8)
2 + 0.1	4 ef (5.31)	20.8 bcd(21.56)	24 cd (20.3)	20.4 bc (21.32)
2 + 0.3	35.6 b (36.34)	21.2 bc (26.62)	15.6 cd (15.46)	9.6 cd (11.7)
2 + 0.5	15.2bcd(22.45)	32 ab (31.38)	52 ab (43.37)	28 ab (28.85)
2 + 0.8	17.6 bcd (22.32)	14.4 bcde (20.04)	17.6 bcd (22.32)	14.4 bc (20.03)
BBD mg L ⁻¹ (IBA + BA)	İlk yıl dinlenme dönemi	İlk yıl çiçeklenme dönemi	İkinci yıl dinlenme dönemi	İkinci yıl çiçeklenme dönemi
0.1 + 0.3	0 f (0)	0 f (0)	0 d (0)	0 d (0)
0.3 + 0.9	0 f (0)	4 ef (5.31)	7.6 cd (10.33)	0 d (0)
0.5 + 1.5	27.2 bc(31.15)	0 f (0)	16 cd (18.47)	8 cd (10.62)
0.8 + 2.4	80 a (66.21)	52 a (46.15)	64 a (59.31)	43.6 a (41.01)
1.0 + 3.0	7.6 def (12.28)	4 ef (5.31)	11.6 cd (13.03)	5.6 cd (8.6)
Toplam BBD (Dönem ortalaması)	18.84 a (19.95)	13.30 ab (14.91)	16.17 a (16.90)	10.34 b (11.76)

***LSD_{1.Dinlenme}=14.584; ***LSD_{1.Çiçeklenme}=15.947; ***LSD_{2.Dinlenme}=22.681; ***LSD_{2.Çiçeklenme}=17.025; *LSD_{Toplam BBD} = 5.106; (* p<0.05; *** p<0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur). Sütunlardaki ve alt satırdaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler, yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

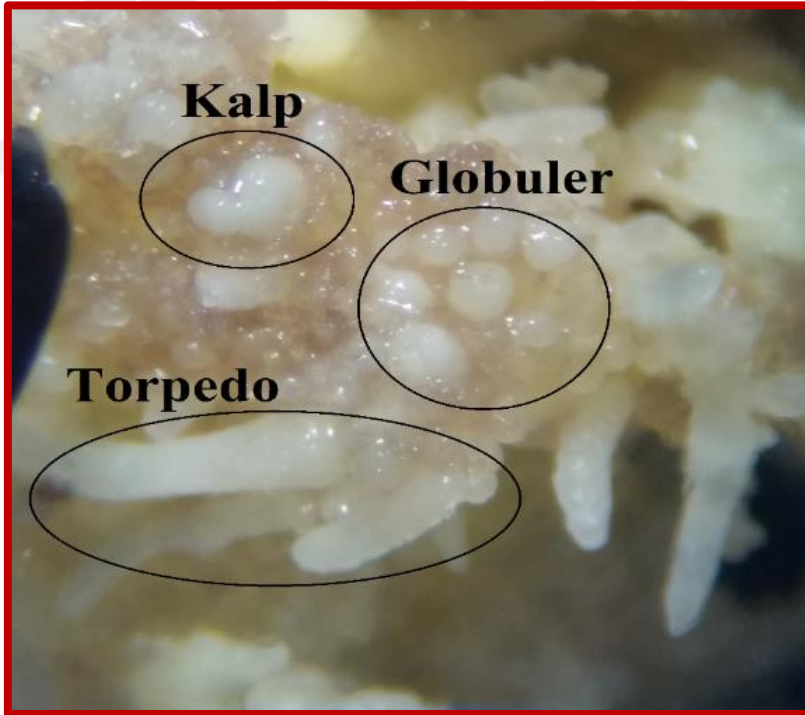
Aynı dönem içinde gelişmiş olan kallus oranları incelendiğinde, BBD ortalamalarının, % 10.34 ile % 18.84 arasında olduğu görülmüştür. En yüksek kallus oranı, % 80 ile ilk yıl dinlenme dönemi denemesinde, 0.8 mg L^{-1} IBA + 2.4 mg L^{-1} BA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Diğer dönemlere ait sonuçlar incelendiğinde, en yüksek kallus oranının her denemede aynı konsantrasyonda (0.8 mg L^{-1} IBA + 2.4 mg L^{-1} BA) elde edildiği görülmüştür. Dönem ortalamaları arasındaki farklılıklar incelendiğinde, kallus oluşum oranları üzerine olan dönem etkisinin, $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kallus oranı, ilk yıl dinlenme dönemi denemesinden elde edilmiş olup, bunu ikinci yıl dinlenme dönemi izlemiştir. Kallus oluşumunun dinlenme döneminde daha yüksek olması, dinlenme dönemindeki yumruların daha yüksek bir rejenerasyon potansiyeli olduğunu göstermektedir. *C. persicum* ve *C. graecum* türlerinde ortaya çıkan dönemler arası rejenerasyon farklılığı, *C. coum* türünde oluşan kallus oranları üzerinde de görülmektedir.

Tez çalışması süresince, *C. coum* türü ile kurulmuş olan denemelerde iki kez embriyojenik kallus (Şekil 4.18) ve ardından somatik embriyo (Şekil 4.19) yapılarının geliştiği gözlenmiştir.

Bu SE oluşumlarından ilki, çiçeklenme döneminde; 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP içeren ortamdan gözlenmiştir. Diğeri ise, dinlenme döneminde; 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.3 mg L^{-1} 2iP ilave edilmiş besi ortamından sağlanmıştır. Ancak her iki denemede de bu yapılar, yalnızca tek bir eksplanttan elde edilmiştir. Bu nedenle, yapılan istatistik analizlerde BBD dozlarının, SE oluşumu üzerine olan etkisi önemsiz ($\text{Prob} > F$; 0.4664) bulunmuştur. Embriyojenik kallus yapılarının, deneme genelinde gözlenen siyah ve kompakt kallus yapılarının içerisinden hızla gelişerek ortaya çıkan beyaz renkli ve dağılgan yapılar olduğu gözlenmiştir. Renk ve doku olarak diğer kalluslardan ayrılan bu yapılar, BBD içermeyen besi ortamına alınması ile birlikte somatik embriyo yapıları oluşmaya başlamıştır.



Şekil 4.18. *C. coum* türünde gelişmeye başlayan embriyojenik kallus



Şekil 4.19. *C. coum* türüne farklılaşmaya başlayan embriyojenik kallus ve üzerinde oluşmaya başlayan globuler, kalp ve torpedo aşamalarındaki SE yapıları

4.3.4. *C. cilicium* Türüne Ait Bulgular

Tez çalışmasına kullanılan *C. cilicium* türüne ilişkin gerçekleştirilen ilk deneme 2016 yılı Haziran ayında kurulmuş olan dinlenme dönemi denemesidir. Takip eden sürede kurulan denemelerle birlikte iki yıl çiçeklenme ve iki yıl dinlenme dönemi olmak üzere toplamda dört farklı deneme kurulmuştur. Bu denemelerden ilk ikisinde BBD olarak 2,4-D (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹) ve 2iP (0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) ile IBA (0.1, 0.3, 0.5, 0.8 ve 1.0 mg L⁻¹) ve BA'nın (0.3, 0.9, 1.5, 2.4 ve 3.0 mg L⁻¹) farklı doz kombinasyonları denenmiştir. Kurulan diğer iki denemede ise yalnızca 2,4-D ve 2iP (sırası ile 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹ ve 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) kombinasyonları kullanılmıştır.

Çalışma süresince türe ait yumrulardan elde edilen kallus oranları incelendiğinde türün rejenerasyon yeteneğinin *C. graecum* ve *C. persicum* türünden farklı olarak oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Diğer türlerle aynı kültür koşullarında ve aynı dönemlerde *in vitro* kültüre alınmalarına karşın *C. cilicium* türünde her hangi bir kök veya sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Bununla birlikte, ilk iki denemede kullanılmış 1/3 oranındaki IBA-BA konsantrasyonlarında kallus yapısı dahi oluşmamış ve her hangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Bu nedenle istatistik analiz yapılırken IBA ve BA dozlarına yer verilmemiştir. Yüksek oksin düşük sitokinin kullanımında ise elde edilen kallus yapıları *C. persicum* ve *C. graecum* türlerinde elde edilenlere nazaran düşük oranlarda olmasının yanı sıra elde edilen kallus yapıları kütle olarak da oldukça küçüktür (en fazla 5 mm çapında). Tamamına yakını siyah ve sert yapıda olan bu kallus yapılarının gelişimi ilerleyen alt kültürlerde tamamen durmuştur.

Çizelge 4.26. *C. cilicium* türünde elde edilmiş olan kallus oranları

BBD mg L ⁻¹ (2,4-D + 2iP)	İlk yıl dinlenme dönemi	İlk yıl çiçeklenme dönemi	İkinci yıl dinlenme dönemi	İkinci yıl çiçeklenme dönemi
0.5 + 0.1	0 f (0)	0 d (0)	0 f (0)	0 c (0)
0.5 + 0.3	0 f (0)	0 d (0)	0 f (0)	0 c (0)
0.5 + 0.5	0 f (0)	0 d (0)	0 f (0)	0 c (0)
0.5 + 0.8	0 f (0)	0 d (0)	0 f (0)	0 c (0)
1 + 0.1	0 f (0)	0 d (0)	13.6 cd (18.18)	0 c (0)
1 + 0.3	0 f (0)	8 cd (10.63)	20 abcd (23.79)	0 c (0)
1 + 0.5	26.4bc(30.68)	18.8 abc (22.87)	26 ab (30.43)	19.6 a (26.27)
1 + 0.8	23.6cd(28.81)	16 bc (18.47)	12 cde (15.94)	14 ab (19.63)
1.5 + 0.1	8 ef (10.63)	7.6 cd (10.33)	12 de (13.16)	12 ab (15.94)
1.5 + 0.3	44 ab (41.54)	16 bc (18.47)	12 de (13.16)	16 ab (21.25)
1.5 + 0.5	16 cde(21.25)	8 cd (10.63)	15.6bcd (19.23)	12 b (13.16)
1.5 + 0.8	12 de (18)	14.8 bc (17.55)	21.2 abc (26.88)	8 bc (10.63)
2 + 0.1	16 cde(21.25)	12 bc (15.94)	0 f (0)	0 c (0)
2 + 0.3	24 cd (26.31)	16 bc (18.47)	4 ef (5.31)	18.4 ab (22.53)
2 + 0.5	32 bc (31.39)	28 ab (28.85)	30 a (32.74)	8 bc (10.63)
2 + 0.8	51.2 a (45.69)	32 a (33.94)	26.8 ab (30.71)	20 a (26.57)
Toplam BBD	15.83a(17.22)	11.08 ab (12.88)	12.08ab(14.35)	8.00 b (10.41)

***LSD_{1.Dinlenme}=11.420; ***LSD_{1.Çiçeklenme}=14.271; ***LSD_{2.Dinlenme}=12.190; ***LSD_{2.Çiçeklenme}=12.070; *LSD_{Toplam BBD}=4.867; (*p<0.05; ***p<0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur). Sütunlardaki ve alt satırdaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler, yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Dönemler arasındaki kallus gelişim oranları arasındaki farklılıklar incelendiğinde kültüre alınma döneminin kallus rejenerasyonu üzerinde p<0.05

önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir. İlk yıl dinlenme dönemi (% 11.08 ab) ile ikinci yıl çiçeklenme dönemi (% 12.08 ab) arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli değilken, ilk yıl ve ikinci yıl verileri kendi içlerinde karşılaştırıldığında dinlenme dönemlerindeki rejenerasyon oranlarının istatistiki olarak önemli ($p < 0.05$) düzeyde farklı oldukları görülmüştür. *C. cilicium* türünde gözlenmiş olan dönemler arasındaki rejenerasyon farklılığı *C. persicum*, *C. graecum* ve *C. coum* türünde gözlenen farklılıklar ile paralellik göstermektedir. *C. cilicium* türünde elde edilen bu bulgu, diğer türler ile birlikte, yumru eksplantlarının dinlenme döneminde daha yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olduğu sonucunu desteklemektedir.

C. cilicium yumru eksplantları ile kurulmuş olan toplam dört rejenerasyon denemesinde yalnızca bir kez, ikinci yıl dinlenme dönemi denemesinde, 2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} 2iP ilave edilmiş besi ortamında somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.21). Yapılan varyans analizinde BBD dozlarının SE oluşumu üzerine olan etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Prob > F; 0.4664).



Şekil 4.20. *C. cilicium* türünde elde edilen SE yapılarının görünümü A) Farklı gelişim evresinde bulunan somatik embriyoları B) Globuler aşamada bulunan SE yapıları C) Kalp aşamasında bulunan bir SE yapısı D) Torpedo aşamasında bulunan SE yapıları

4.3.5. *C. pseudibericum* Türüne Ait Bulgular

C. pseudibericum türünde gerçekleştirilen ilk deneme, 2016 yılı bahar aylarında *C. persicum* türü ile birlikte kurulan birinci çiçeklenme dönemi denemesidir. Takip eden süre içerisinde dinlenme dönemi denemesi diğer tüm türlerle birlikte kurulmuş ve denemeler ikinci yılda tekrar edilmiştir. *C. pseudibericum* türüne ait yumru parçaları kullanılarak, iki yıl çiçeklenme ve iki yıl dinlenme dönemi olmak üzere toplamda dört farklı deneme kurulmuştur. Bu denemelerden ilk ikisinde, 2,4-D (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹) ve 2iP (0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) ile IBA (0.1, 0.3, 0.5, 0.8 ve 1.0 mg L⁻¹) ve BA'nın (0.3, 0.9, 1.5, 2.4 ve

3.0 mg L⁻¹) farklı konsantrasyon ve kombinasyonları denenmiştir. IBA ve BA kullanımı ile rejenerasyon sağlanamadığı için, takip eden iki denemede yalnızca 2,4-D ve 2iP (sırası ile 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg L⁻¹ ve 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.8 mg L⁻¹) kullanımına devam edilmiştir.

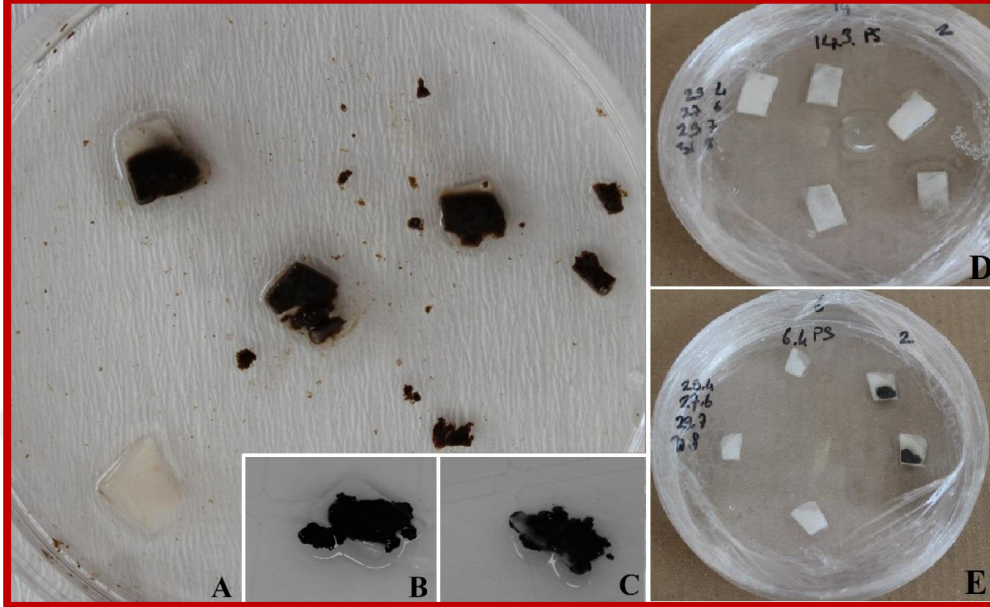
Çizelge 4.27. *C. pseudibericum* türünde elde edilmiş olan kallus oranları

BBD mg L ⁻¹ (2,4-D + 2iP)	İlk yıl dinlenme dönemi	İlk yıl çiçeklenme dönemi	İkinci yıl dinlenme dönemi	İkinci yıl çiçeklenme dönemi
0.5 + 0.1	20 a (26.56)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
0.5 + 0.3	4 cd (5.31)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
0.5 + 0.5	0 d (0)	4 bc (5.31)	0 (0)	0 d (0)
0.5 + 0.8	12 b (15.94)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
1 + 0.1	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
1 + 0.3	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
1 + 0.5	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
1 + 0.8	0 d (0)	0 c (0)	4 (5.3)	16 bc (15.69)
1.5 + 0.1	8 bc (14.62)	0 c (0)	0 (0)	0 d (0)
1.5 + 0.3	0 d (0)	0 c (0)	4 (5.3)	0 d (0)
1.5 + 0.5	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	8 cd (7.85)
1.5 + 0.8	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	44 a (38.53)
2 + 0.1	0 d (0)	0 c (0)	0 (0)	12 bcd (13.16)
2 + 0.3	16 ab (18.47)	12 b (13.16)	12 (10.15)	0 d (0)
2 + 0.5	0 d (0)	8 bc (7.85)	8 (10.62)	0 d (0)
2 + 0.8	0 d (0)	20 a (23.78)	20 (18)	20 ab (26.56)
Toplam BBD	2.75 (3.13)	3.75 (5.06)	6.25 (6.36)	3.00 (3.01)

LSD 1. Dinlenme= 9.346; ***LSD 1. Çiçeklenme= 9.991; LSD 2. Dinlenme= Ö.D.; ***LSD 2. Çiçeklenme = 13.517; LSD Toplam BBD=Ö.D. ()p<0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur) Sütunlardaki harfler birbirlerinden bağımsızdır. Parantez içerisindeki değerler, yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış değerlerdir.

Çalışma süresince türe ait yumrulardan yalnızca düşük (en fazla % 44; Çizelge 4.27) oranlarda kallus elde edilebilmiştir. *C. pseudibericum* türünde elde edilen kallus oranları incelendiğinde, türün rejenerasyon yeteneğinin *C. graecum* ve *C. persicum* türünden farklı olarak oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Diğer türlerle aynı kültür koşullarında ve aynı dönemlerde *in vitro* kültüre alınmalarına karşın, *C. pseudibericum* türünde her hangi bir organojenik yapı oluşumu gözlenmemiştir. Bununla birlikte, ilk iki denemede kullanılmış 1/3 oranındaki IBA-BA konsantrasyonlarında, kallus yapısı dahi oluşmamıştır. Yüksek oksin düşük sitokinin kullanımında ise elde edilen kallus yapıları, *C. persicum* ve *C. graecum* türlerinden elde edilenlere nazaran düşük oranlarda olmasının yanı sıra kütle olarak da oldukça küçüktür (en fazla 5 mm çapında). Tamamına yakını siyah ve sert yapıda olan bu kallus yapılarının gelişimi ilerleyen alt kültürlerde tamamen durmuştur. Denemeler kuruldukları dönemlere göre karşılaştırıldıklarında, elde edilmiş en yüksek kallus oranı (BBD toplamları) % 6.25 ile ikinci yıl dinlenme döneminde gözlenmiştir. Ancak BBD ortalamalarına ilişkin elde edilmiş olan bu verilere varyans analizi (ANOVA) yapıldığında, gözlenen farklılık istatistiki olarak önemsiz (Prob > F; 0.2321) bulunmuştur.

Kurulan denemelerde alt kültür işlemlerine 1 yıl süre ile devam edilmiştir. Bu süre içerisinde eksplantlar canlılığını korumaya devam ederken, her hangi bir kallus oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.21. *C. pseudibericum* türüne ait eksplantların genel görünümü, A, B ve C) farklı BBD konsantrasyonlarında elde gözlenen siyah renkli kompakt kallus yapıları, D) *In vitro* kültürün 6. ayında kararına veya herhangi bir rejenerasyon gözlenmeyen eksplantlar, E) Bir kısmı kararmış eksplantlar

Bu bölüme kadar, yumruların farklı dönemlerde kültüre alınması kapsamında *C. persicum*, *C. graecum*, *C. coum*, *C. cilicium* ve *C. pseudibericum* türleri ile kurulmuş olan *in vitro* denemelere ilişkin bulgular sunulmuştur. Bu denemelerde, doğadan toplanılarak sera koşullarında kültüre alınan türlere ait yumru parçaları, farklı dönemlerde, farklı BBD konsantrasyonları içeren ½ MS besi ortamında *in vitro* kültüre alınarak verdikleri rejenerasyon tepkileri incelenmiştir. Dinlenme ve çiçeklenme dönemi olmak üzere iki farklı dönemde kurulan denemelerde vejetasyon dönemleri ve türler arasında büyük farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, aynı türe ait genotiplerin aynı BBD konsantrasyonlarına farklı tepkiler verdiği tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen ilk *in vitro* rejenerasyon çalışmaları daha çok *C. persicum* türü ile sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalarda öncelikle, enfeksiyon problemlerine daha sonra ise vejetatif çoğaltıma odaklanılmıştır (Jalali ve ark., 2012). Soğanlı bitkiler

ile gerçekleştirilen toprak altı organların kullanıldığı çalışmalarda, farklı türlerde karşılaşılan enfeksiyon oranlarının % 50'lere kadar çıkabildiği ve enfeksiyonu en fazla etkileyen faktörün materyalin yetiştiği ortam ve iklim koşulları olduğu belirtilmektedir (Gürlek, 2011). *In vitro* siklamen çalışmalarında yumru parçalarının eksplant kaynağı olarak kullanılması halinde rejenerasyon oranının diğer organlara göre daha yüksek olduğu bu araştırmalarda belirtilmesine karşın (Geier, 1977; Ando ve Murasaki, 1983), karşılaşılan enfeksiyon problemleri araştırmacıları yumru kullanımından uzaklaştırmıştır. Bu nedenle güncel çalışmalarda, *in vivo* koşullarda yetişen veya doğal türlere ait yumru parçalarının eksplant kaynağı olarak kullanımına rastlamak pek mümkün olmamakla birlikte daha çok aseptik (*in vitro*) koşullarda yetişen bitkiler tercih edilmektedir (Teixeira da Silva, 2016).

Seyring ve ark. (2009) gerçekleştirdikleri çalışmada *C. africanum*, *C. cilicium*, *C. coum*, *C. hederifolium*, *C. persicum* ve *C. purpurascens* türlerini kullanarak embriyo benzeri yapılar elde etmiştir. Prange ve ark. (2010) ise *C. coum*, *C. alpinum*, *C. mirabile* ve *C. graecum* türlerinde somatik embriyo oluşumlarını incelemişlerdir. Benzer bir çalışma Furukawa ve ark. (2001) tarafından *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens* ve *C. rohlfianum* gibi farklı siklamen türlerini kullanarak gerçekleştirilmiştir. İzgü ve ark. (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada, Türkiye'de endemik olan *C. cilicium*, *C. parviflorum*, *C. mirabile* ve *C. pseudibericum* olmak üzere dört farklı siklamen türünde etkin bir somatik embriyo protokolü geliştirmişlerdir. Farklı araştırmacı gurupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda SE yapılarının yanı sıra organojenik yapılar da elde edilmiş ve somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitki rejenerasyonunun organogenesis yöntemine nazaran düşük olduğu belirtilmiştir (Tagipur ve ark., 2016). Tez çalışmasında da, bu çalışmalara paralel olarak, elde edilmiş olan organojenik yapıların SE oluşumundan oldukça yüksek oranda olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte araştırmacılar farklı toprak üstü organların eksplant kaynağı olarak kullanılması ile geliştirdikleri somatik embriyo protokollerinin, her siklamen türünde çalıştığını ancak bu türlere ait tüm eksplantlarda somatik embriyo oluşumu elde edilmediğini bildirmişlerdir (Schwenkel ve Winkelmann, 1998, Seyring ve ark., 2009; Tagipur ve ark., 2016). İzgü ve ark., (2016) farklı tür ve eksplant tiplerini kullandıkları çalışmalarında tür ve eksplanta göre % 39 (*C. pseudibericum*; yaprak sapı) ile % 0.8 (*C. mirabile*; petiol) arasında değişen oranlarda SE oluşumu gözlemişlerdir. Tez çalışmasında dönemler ve BBD konsantrasyonları arasındaki farklılıklar incelendiği için eksplantlar arası farklılıkları gözlemlemek mümkün olmamıştır. Ancak, çalışmada SE oluşumu gözlenen genotiplerde farklı organların kullanılması halinde yüksek SE oluşumlarını elde etmenin mümkün olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Seyring ve ark., (2009) 6 farklı siklamen türü ile çalışmış ancak *C. cilicium* ve *C. coum* türlerinde sürgün elde edememişlerdir, yine aynı çalışmada eksplantlar arasında büyük farklılıkların gözlemlendiği rapor edilmiştir. Prange ve ark., (2010) ise *C. mirabile* ve *C. graecum* türünde 1, *C. alpinum* türünde ise sadece 2 adet genotipte embriyojenik kallus elde etmişler, sonuçların eksplant tipi ve türe göre farklı olduğunu belirtmişlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmalara benzer olarak, yürütülmüş olan tez çalışmasında, *C. persicum* ve *C. graecum* türlerinde yüksek oranlarda organojenik yapılar elde edilirken diğer türlerde organojenik yapı oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilmiş olan SE yapıları da türlere göre farklılık göstermiş olup *C. pseudibericum* ve *C. graecum* türlerinde SE yapılarına rastlanılmamıştır. Çalışmamıza paralel olarak Furukawa ve ark., (2001) *C. cilicium* ve *C. coum* türlerinde elde edilen kallus oluşumunun daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantın yaşı *in vitro* rejenerasyon başarısını etkileyen bir diğer faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Pek çok çalışmada aseptik (*in vitro*) koşullarda elde edilmiş olan genç bitki parçalarının (Kreuger ve ark., 1995; Furukawa ve ark., 2002) veya diğer genç bitki organlarının kullanıldığı

(Seyring ve ark., 2009; Jalali ve ark., 2010b; Yang ve Zhang, 2010; Tagipur ve ark., 2016) dikkati çekmiştir. Bununla birlikte eksplant yaşının rejenerasyon üzerine olan etkisini konu alan çalışmalar incelendiğinde bu farklılık daha net görülmektedir. *Solanum melongena* fidelerine ait köklerin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada 15, 30 ve 45 günlük fidelerde rejenerasyon oranının sırası ile % 80, % 60 ve % 33 olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir (Franklin ve ark., 2004). Süs bitkisi (*Saussurea obvallata*) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise 5 günden genç ve 20 günden yaşlı eksplantlarda rejenerasyon oranının ciddi derece düşük olduğu, *in vitro* rejenerasyon için en uygun fidelerin 10 ila 15 günlük olduğu bildirilmiştir (Dhar ve Joshi, 2005). Tez çalışmasında genotip etkisini minimumda tutabilmek için tek bir yumrudan en fazla sayıda eksplant elde edilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle denemelerde mümkün olduğunca büyük, dolayısı ile yaşlı yumrular kullanılmıştır. Organların yaşlanması ile birlikte bitkinin sahip olduğu endojen hormonlardaki değişimlerin, elde edilen somatik embriyo oranını olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Kreuger ve ark., (1995) yumru parçaları küçüldükçe elde edilen pro-embriyonik kültür oluşumunun teşvik edildiği rapor edilmiştir, ancak araştırmacılar bizim çalışmamızdan farklı olarak *in vitro* fidelere ait genç yumru parçaları kullanmışlardır.

Tez çalışmasında elde edilen veriler incelendiğinde türler arasında ve tür içinde büyük oranda genotip etkisi olduğu görülmektedir. Genotip etkisinin bitkilerin sahip olduğu farklı endojen hormonlardan veya farklı genotiplerin dışarıdan uygulanan (ekzogen) BBD'lere tepki verme yeteneğinin farklılığından kaynaklandığı farklı araştırmacılar (Geier, 1977; Jimnez, 2001; Winkelmann ve Serek, 2005) tarafından ileri sürülmüştür.

Tez çalışması süresince pek çok eksplantta hem kök benzeri yapıların hem de sürgün ve yaprak oluşumlarının bir arada geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23). Bazı durumlarda ise üzerinde kök benzeri yapıların yer aldığı eksplanttan SE yapılarının gelişebildiği görülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.22. *C. persicum* türünde kök benzeri yapılar ve sürgün yapılarının aynı eksplant üzerinde gelişimi



Şekil 4.23. *C. graecum* türünde farklı organojenik yapıların aynı eksplant üzerinde gelişimi, A) Eksplantın genel görünümü, B) Üzerinde emici tüyler bulunan kök benzeri yapılar (K) ile yaprak taslaklarının (S) yakından görünümü

Tez çalışmasında elde edilmiş olan bu bulgulara paralel olarak, Seyring ve ark., (2009), 2 mg^l⁻¹ 2,4-D ve 0,8 mg^l⁻¹ 2iP içeren besi ortamında somatik embriyo yapılarının yanı sıra sürgün yapılarının da elde edildiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Jalali ve ark., (2010) aynı bitkiye ait farklı dokuların sahip olduğu doğal oksin sitokinin aktivitesinin ekzogen bitki büyüme düzenleyicilere verdiği tepkileri etkilediğini belirtmiştir. Araştırmacıların bulgularına göre tepkiler dışarıdan uygulanan bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarından daha önemli olabilmekte ve bu nedenle aynı ekzogen dozlarda (besi ortamında) bile varyasyonlara yol açmaktadır. Yapılmış olan bu çalışmalar, tez çalışması kapsamında aynı BBD dozunda farklı organojenik yapıların bir arada ortaya çıkabilmesini açıklamaktadır. Bununla birlikte aynı eksplant üzerinde kök, sürgün hatta somatik embriyo yapılarının bir arada gelişebilmesi durumuna da açıklık getirmektedir. Winkelmann ve ark., (1998) *Cyclamen persicum* cv. Purple Flamed çeşidi ile yürüttükleri çalışmada ½ MS ortamına 2 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.8 mg L⁻¹ 2iP ilave edilmesi ile aynı kültür çeşidinden hem embriyojenik (kahverengimsi yumuşak yapılı) hem de embriyojenik olmayan (sarı renkli dağınık) kallus yapıları elde etmişlerdir. Jimnez (2001), aynı eksplant üzerinde hem somatik embriyogenesis hem de organogenesis oluşumunun gözlemlendiği rapor edilmiştir, ancak araştırmacı bu iki farklı oluşumun aynı eksplant üzerindeki farklı hücre katmanlarından geliştiğini bildirmiştir. Bu veriler ışığında, tez çalışmasında, aynı BBD konsantrasyonları ve eksplant üzerinde hem organojenik hem de embriyojenik yapıların gözlemlenmiş olması beklenen bir durumdur.

Tez çalışmasında 3 türde, farklı BBD konsantrasyonlarında SE yapıları elde edilmiştir. Bu konsantrasyonlar tür bazında Çizelge 4.28'de yer almaktadır. Elde edilmiş olan bu veriler siklamen türlerinde SE oluşumunu inceleyen pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiş olan bulgular ile paralellik göstermektedir. Winkelmann (2010) *C. persicum* türünde 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.8 mg L⁻¹ 2iP kullanımı ile başarılı sonuç elde edildiğini bildirmiştir. İzgü ve ark., (2016) ise *C.*

pseudibericum türünde $2,5 \text{ mg L}^{-1} + 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2 iP}$ ve $2,5 \text{ mg L}^{-1} + 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP}$, *C. cilicium* türünde $2 \text{ mg L}^{-1} + 1,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP}$, *C. mirabile* türünde ise $2 \text{ mg L}^{-1} + 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP}$ dozlarında SE yapıları elde etmişlerdir. Prange ve ark., (2010) da embriyojenik kallus oluşturmak için *C. coum* türünde eksplantları önce $0,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2,4-D} + 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA}$ ve 4-6 ay sonra $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2,4-D} + 0,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP}$ ortamında kültüre aldıklarını bildirmiştir.

Çizelge 4.28. Farklı türlerde somatik embriyo elde edilen BBD konsantrasyonları

Tür	BBD mg L^{-1} (2,4-D + 2iP)
<i>C. persicum</i>	2 + 0.5 ve 1.5 + 0.8
<i>C. coum</i>	2 + 0.5 ve 2 + 0.3
<i>C. cilicium</i>	2 + 0.5

Tez çalışması süresince elde edilmiş olan SE yapılarının çimlenme oranları türlere göre farklılık göstermiştir. *C. persicum* türünde çimlenme bakımından sorun yaşanılmazken, *C. cilicium* ve *C. coum* türlerinde bu oranın daha düşük olduğu kaydedilmiştir. Tür bazında elde edilmiş olan bu farklı çimlenme oranları diğer araştırmalar ile paralellik göstermektedir. Prange ve ark., (2010a) *C. coum* türüne ait somatik embriyolarda elde ettikleri çimlenme oranının % 0 ila % 10 arasında değiştiğini ve bunun *C. persicum* türündeki çimlenme oranının çok altında olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Sevindik (2018) somatik embriyoların globuler veya torpedo aşamasında tutuklu kaldıkları için çimlenme konusunda sıkıntı yaşadığını rapor etmiştir.

Tez çalışması süresince yapılan gözlemler neticesinde rejenerasyonun kullanılan BBD konsantrasyonlarından çok genotipe bağlı olduğu tespit edilmiştir. Özellikle iki farklı genotipin karşılaştırıldığı *C. graecum* türü ile kurulan denemede bir genotip organojenik kallus yapıları oluştururken, diğer genotipten elde edilen kallus yapılarında hiçbir şekilde organ farklılaşması gözlenmemiştir. Bununla birlikte siklamen türlerinde organogenesis konu alan pek çok araştırmada rutin

olarak kullanılmakta olan IBA ve BA bizim tez çalışmamızda beklenen sonucu vermemiştir. Çalışma süresince IBA ve BA kullanımı ile hiç bitkicik elde edilemezken sürgün oranları 2,4-D ve 2iP kullanılan ortamların oldukça gerisinde kalmıştır. Mayer (1956) ve Stichel (1959) NAA dozunun direk olarak organ farklılaşmasını etkilediğini, 0,3 mg/l altında sürgün, 0,5 mg/l üzerinde kök, 0,3-0,5 mg/l arasında ise her iki organın bir arada geliştiğini tespit etmiştir. Geier (1977) benzer şekilde oksin/sitokin dengesine bağlı olarak kök veya sürgün yapıları elde etmiştir. Ancak bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada aynı besi ortamı içerisinde hem kök hem de sürgün benzeri yapıları gözlemek veya hiç bir BBD dozunda organojenik yapı gelişimi göstermeyen genotiplere rastlamak mümkün olmuştur. Okumoto ve Takabayashi (1968), sürgün oluşumu için NAA'nın 0,1 mg/l dozunda yalnız başına yeterli olduğunu, % 49 ile en yüksek sürgün oranına ise 1 mg/l NAA ile 20 mg/l adenin sülfatın bir arada kullanımı ile ulaşıldığını tespit etmiştir. Araştırmacılar siklamen yumrularının uygun koşullarda sürgün ve kök oluşturma yetenekleri olduğu için, çalışmada dışarıdan BBD uygulaması olmaksızın organ oluşumlarının gözlendiğini belirtmişlerdir. Prange ve ark., (2008) ½ MS ortamına 0.5 mg L⁻¹ NAA + 1.0 mg L⁻¹ BA veya 0.5 mg L⁻¹ IAA + 1.0 mg L⁻¹ BA ilavesi ile optimum sürgün gelişimi elde etmişlerdir. Araştırmada ayrıca aynı türe ait farklı genotiplerin ortamlara farklı tepkiler verdiği vurgulanmıştır. Bunun yanında düşük sitokin kullanımında yüksek kök gelişimi gözlendiği ve bunun muhtemelen dokuda yer alan yüksek ekzogen oksin nedeni ile olduğu belirtilmiştir. Yamaner ve Erdağ (2008) diğer pek çok çalışmada karşılaştığı gibi aynı bitkiden alınan eksplantlar arasında ciddi rejenerasyon farklılıkları tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bunun büyük oranda hücrelerin eksplant kaynağına bağlı olarak bitki büyüme düzenleyicilere verdikleri farklı tepkilerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında hücrelerin sahip olduğu endojen hormon seviyeleri ile oksin sitokin oksidaz aktivitesinin de etkili olabileceğini not etmişlerdir. Karam ve Al-Majathoub (2000a) *in vitro* rejenerasyonun, sukroz ve BBD konsantrasyonu, sabit veya hareketli

kültür ortamı, eksplant tipi, bitki gelişim evresi ve kültür varyetesi (genotip) gibi faktörlerden etkilendiğini bildirmişlerdir. Özellikle eksplant tipleri arasındaki farklılığın hücrelerin sahip olduğu endojen hormon seviyelerindeki farklılıklar ve hücrelerin dışarıdan uygulanan hormonlara farklı hassaslık seviyesinde tepki vermeleri nedeni ile olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılmış olan tüm bu çalışmalar ışığında, tez çalışmasına ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, embriyogenesis çalışmalarında olduğu gibi, organogenesis çalışmalarının da genotip ve eksplant kaynağı gibi değişkenlerden etkilendiği görülmektedir. Yürütülmüş olan çalışmada genotiplerin aynı BBD dozlarına vermiş oldukları farklı rejenerasyon tepkileri, tüm denemelerde gözlenmiştir.

Tez çalışmasında, farklı dönemlerde kurulmuş olan denemeler karşılaştırıldığında, dinlenme döneminde olan yumruların daha yüksek bir rejenerasyon yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Dönemler arasındaki rejenerasyon farklılıklarını konu alan araştırmalar incelendiğinde benzer sonuçlara rastlamak mümkündür. Prasad ve Chaturvedi, (1988) kasımpatı üzerine gerçekleştirdikleri organogenesis çalışmasında 2 aylık periyotlar halinde yıl boyu 6 deneme kurmuşlar ancak yalnızca mart - nisan ayındaki denemeden sağlıklı bitki elde edebilmişlerdir. Benzer şekilde zencefil yumruları ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise kış, bahar ve yaz dönemlerinde kültüre alınan eksplantlardan en yüksek sürgün rejenerasyonunun yaz döneminde gözlendiğini bildirilmiştir (Nongalleima ve ark., 2013). *In vitro* başlangıç materyali olarak toprak üstü organlar kullanıldığında bitkinin aktif büyüme döneminde, toprak altı depo organlarının kullanılması durumunda ise bitkinin dinlenme döneminde daha yüksek rejenerasyon elde edildiği görülmektedir. Bu çalışmalar ışığında tez bulguları irdelenmiştir. Depo organı olarak işlev yapan yumrunun yaz aylarında daha yüksek besin içerdiğine sahip olduğu için rejenerasyon oranının dinlenme döneminde daha yüksek olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.24. *C. persicum* türünde farklı genotiplerin aynı BBD konsantrasyonuna gösterdiği farklı rejenerasyon tepkileri



Şekil 4.25. *C. graecum* türünde farklı genotiplerin aynı BBD konsantrasyonuna gösterdiği farklı rejenerasyon tepkileri A) Açık renk, dağılgan yapıda kallus oluşumu ve zayıf kök gelişimi, B) Koyu renk kallus ve yoğun kök oluşumu, C) Koyu renk kallus ve zayıf kök gelişimi, D) Organojenik yapı elde edilemeyen yeşil - sarı renkli kompakt kallus yapısı

4.4. Köklendirme Ve Aklimatizasyon Bulguları

Türlere ait rejenerasyon bulguları incelendiğinde, bazı eksplantlarda BBD dozlarına bağlı olmaksızın sürgün yapılarının kökler ile birlikte geliştiği görülmektedir. Bunun yanında yalnızca sürgünlerden oluşan veya kök yapıları zayıf olan bitkiciklerin köklenmelerini teşvik etmek için besi ortamına 1, 2 ve 3 mg L⁻¹ dozlarında IBA ilave edilmiştir. Her doz için 5 eksplant içeren 5 petri (tekerrür) ile kurulan bu denemede, değişkenler arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Çizelge 4.29. Farklı IBA dozlarında elde edilen köklenme oranları

IBA (mg L ⁻¹)	Köklenme oranları
1	80 (66)
2	88 (74)
3	76 (60)

Parantez içerisindeki değerler açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir

Bu nedenle çalışmada elde edilen köksüz sürgün yapıları, 2 mg L⁻¹ oranında IBA içeren besi ortamında yeterli kök oluşumu elde edilene kadar tutulmuştur. Yaklaşık olarak 8 hafta IBA içeren magentalarda tutulan bitkicikler, ardından dış koşullara aktarılmışlardır. Mohannad ve Karam (2000) köklenme için 0, 0.025, 0.5 veya 1 mg L⁻¹ oranlarında IBA kullanılmıştır. Kontrol ve 0.025 mg L⁻¹ dozunda köklenme gözlenmezken, 0.5 ve 1 mg/l dozlarında sırası ile %86 ve %100 oranlarında kök elde edilmiştir. Tez çalışmasında ise çoğunlukla köklendirme işlemi için ayrıca BBD kullanımı gerekmeden sürgün yapılarının köklendiği gözlenmiştir.

Aklimatizasyon aşamasında ise, kültür odasından sera koşullarına aktarıldıktan 1 ay sonra canlı kalan bitkilerin adedi belirlenmiştir. Ardından toplam aktarılan bitki sayıları üzerinden canlı kalan bitkilerin % oranları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.30. *C. persicum* türüne ait alıştırma sonrası yaşama oranları

BBD mg L ⁻¹ (2,4-D+2iP)	İlk yıl çiçeklenme dönemi		İlk yıl dinlenme dönemi		İkinci yıl çiçeklenme dönemi		İkinci yıl dinlenme dönemi	
	0.5+0.1	-	-	-	-	-	-	-
0.5+0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5+0.5	-	-	-	-	-	-	50	1/2
0.5+0.8	-	-	50	4/8	-	-	67	2/3
1.5+0.1	-	-	58	7/12	-	-	60	3/5
1.5+0.3	-	-	50	1/2	-	-	50	1/2
1.5+0.5	-	-	48	12/25	-	-	70	7/10
1.5+0.8	-	-	28	7/25	-	-	75	9/12
1+0.1	-	-	38	3/8	-	-	-	-
1+0.3	0	0/12	-	-	60	3/5	-	-
1+0.5	0	0/10	18	3/17	80	4/5	60	12/20
1+0.8	-	-	44	14/32	-	-	53	8/15
2+0.1	0	0/15	44	8/18	88	15/17	64	7/11
2+0.3	-	-	42	5/12	-	-	88	15/17
2+0.5	0	0/28	85	17/20	56	5/9	93	26/28
2+0.8	0	0/8	63	5/8	50	5/10	86	18/21
Toplam	0	0/73	47	86/187	67	32/46	68	109/146

Dönemlere ait ilk sütunda yer alan değerler yüzde (%) olarak yaşam oranlarını, ikinci sütun ise yaşayan / aktarılan bitkicik sayılarını göstermektedir.

Buna göre *C. persicum* türünde en yüksek yaşama oranı % 93 ile 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren besi ortamından elde edilen bitkiciklerde gözlenmiştir. Dönemlere göre yaşama oranları karşılaştırıldığında, en yüksek hayatta kalan bitkicik oranı % 68 ile ikinci yıl dinlenme dönemi denemesinden gözlenmiştir. Bunun yanında ilk yıl çiçeklenme döneminde elde edilmiş olan bitkiciklerin tamamı, hızla gelişen fungus miselleri nedeni ile kaybedilmiştir. Bu durumun, kullanılan ortamın steril edilmesi sonucunda bozulan fungus dengesi nedeni ile meydana geldiği düşünülmektedir. Tamamen sterilize edilmiş ortamda mevcut bulunan tüm mikroorganizmalar ölmüştür. Fungus misellerinin, kendilerini baskı altına alacak

başka bir organizma kalmadığı için kısa sürede hızla yayılış gösterdikleri düşünülmektedir. Bu nedenle takip eden aklimatizasyon işlemlerinde, torf : perlit ortamı, 90 °C’de 1.5 saat pastörize edilerek kullanılmıştır.



Şekil 4.26. İlk aklimatizasyon denemesinde, tüm bitkilerin kaybına neden olan fungus miselleri A) 2. günde belirgin olmaya başlayan miseller, B) 5. gün ve C) 8. günlerde bitkiciklerin hızlı ölümü

Bunun yanında aklimatizasyon aşamasına ulaşan bitkicikler incelendiğinde, somatik embriyogenesis ile elde edilmiş olan bitkiciklerin yumru oluşturduğu, organogenesis yoluyla gelişmiş olan bitkiciklerin ise yumrusuz olduğu dikkati çekmektedir. Bu bitkiciklerde yumru yapıları dış ortama aktarıldıktan sonra gelişim göstermişlerdir.



Şekil 4.27. Organogenesis ve embriyogenesis yöntemleri ile gelişen bitkiciklerin genel görünümü A) *C. persicum* türünde SE ile elde edilen yumrulu bir bitkicik B) *C. persicum* türüne ait organogenesis ile elde edilen bir bitkicik C) *C. graecum* türüne ait organogenesis yöntemi ile elde edilen yumrusuz bir bitkicik



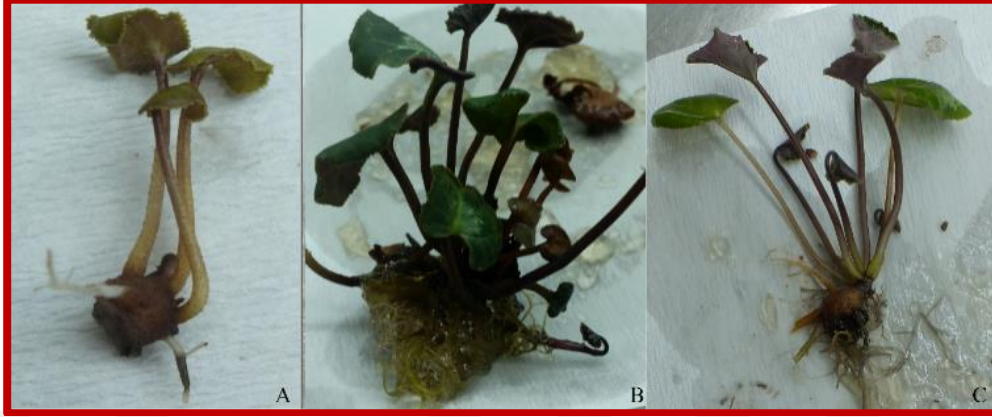
Şekil 4.28. A) organogenesis yöntemi ve B) Embriyogenesis yöntemi ile elde edilmiş bitkiciklerin aklimatizasyon sonrası görünüşleri

Çizelge 4.31. *C. graecum* türüne ait alıştırma sonrası yaşama oranları

BBD mg L ⁻¹ (2,4-D+2iP)	İlk yıl çiçeklenme dönemi		İlk yıl dinlenme dönemi		İkinci yıl çiçeklenme dönemi		İkinci yıl dinlenme dönemi	
0.5+0.1	-	-	-	-	-	-	33	1/3
0.5+0.3	-	-	33	1/3	-	-	-	-
0.5+0.5	-	-	67	2/3	-	-	40	2/5
0.5+0.8	-	-	67	2/3	-	-	33	1/3
1.5+0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5+0.3	-	-	-	-	-	-	29	2/7
1.5+0.5	-	-	57	4/7	33	1/3	29	2/7
1.5+0.8	-	-	38	3/8	40	2/5	60	3/5
1+0.1	-	-	-	-	-	-	62	8/13
1+0.3	50	1/2	20	2/10	33	2/6	54	7/13
1+0.5	33	1/3	43	3/7	40	2/5	50	6/12
1+0.8	50	1/2	50	5/10	-	-	64	18/28
2+0.1	75	3/4	33	2/6	-	-	45	5/11
2+0.3	50	1/2	43	3/7	-	-	62	8/13
2+0.5	-	-	80	8/10	88	7/8	100	12/12
2+0.8	-	-	67	8/12	71	5/7	77	10/13
Toplam	52	7/13	50	43/86	50	19/34	59	85/145

Dönemlere ait ilk sütunda yer alan değerler yüzde (%) olarak yaşam oranlarını, ikinci sütun ise yaşayan / aktarılan bitkicik sayılarını göstermektedir.

C. graecum türünde gözlenen yaşama oranları incelendiğinde, en yüksek yaşama oranının % 100 ile 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren besi ortamından elde edilen bitkiciklerde olduğu görülmektedir. Dönemlerin ortalama yaşama oranları incelendiğinde, en yüksek oran % 59 ile ikinci yıl dinlenme döneminde gözlenmiştir.



Şekil 4.29. *C. graecum* türünde elde edilmiş olan bitkicikler

Murasaki ve Tsurushima, (1988) 16 saat 2500 lux aydınlatma altında *C. persicum* türüne ait bitkiciklerin birkaç haftada % 95 yaşama oranı ile dış ortama aktardıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, tez çalışmamız ile benzer olarak organogenesis ile elde edilen bitkiciklerin dış ortama aktarıldıktan sonra mini yumru oluşturduklarını rapor etmiştir. Bunun yanında pek çok araştırmada elde edilmiş olan yaşama oranları büyük bir varyasyon göstermektedir. Prange ve ark., (2010) *C. mirabile* türünde % 88, İzgü ve ark., (2016) *C. persicum* türünde % 70, Abu Qaoud (2004) *C. persicum* türünde % 30 yaşama oranı ile aklimatizasyon işlemini gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda yalnızca *C. graecum* türüne ait bir BBD dozunda % 100 yaşama oranı elde edilmişken Nhut ve ark., (2012) *C. persicum* türünde deneme genelinde % 100 başarı elde ettiklerini rapor etmiştir. Koçak ve ark. (2014) ise, deneme genelinde % 38.3 yaşama oranı gözlemlediklerini bildirirken bu oranın bazı genotiplerde (farklı eksplant kaynaklarında) % 9.5 ila 5.4'e kadar düştüğünü rapor etmiştir. Araştırmacıların ortak görüşü, ilk günlerdeki nem oranının yaşama oranı üzerine genotip veya BBD konsantrasyonundan daha fazla etki ettiği üzerinedir. Bu nedenle tez çalışmada viyoller, plastik kapaklı saklama kaplarına konularak bir hafta süre ile iklim odasında tutulmaya devam edilmiştir. Alıştırma serasında da nem muhafazası için ayrıca alçak plastik tünel kullanılmıştır.

4.5. Sentetik Tohum Denemelerine Ait Bulgular

Sentetik tohum denemeleri için yumru eksplantlarından elde edilen bitki propagülleri kullanılmıştır. Bunun için *C. coum*, *C. cilicium* ve *C. persicum* türlerinde somatik embriyolar, somatik embriyo yapılarının elde edilemediği *C. graecum* türünde ise sürgün uçları kaplanarak denemeler kurulmuştur. Tez çalışmasında yalnızca kallus gelişimi gösteren *C. pseudibericum* türü, gerekli *in vitro* materyal temin edilemediği için, çalışmanın bu kısmında da yer almamıştır.

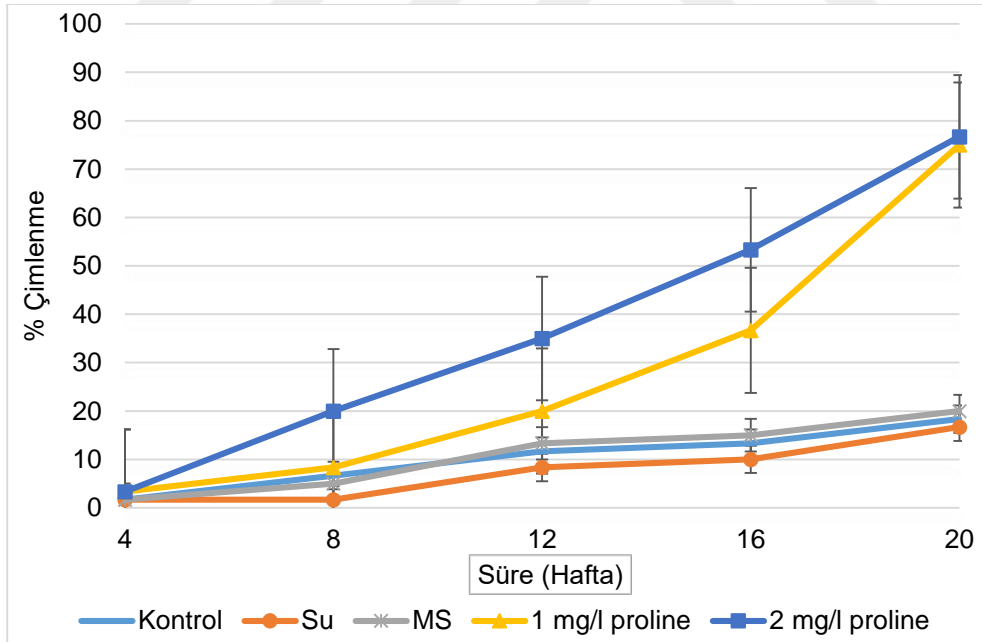
Denemelerde somatik embriyolar ve sürgün yapıları için farklı ortamlar kaplama materyalinin içerisine ilave edilerek kullanılmıştır (Çizelge 4.32). Sodyum aljinat bileşiminde bulunan sodyum molekülü ile yer değiştirerek kaplama işleminin gerçekleşmesini sağlamak için 14,702 g/l oranında hazırlanmış olan steril $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılmıştır. Ön denemelerde kullanılan % 1.5 konsantrasyondaki sodyum aljinat çözeltisi kalsiyum klorür çözeltisine damlatma aşamasında dağıldığı için düzgün şekilli kapsüllerin elde edilmesi mümkün olmamıştır. Bu durum özellikle *C. graecum* türüne ait sürgün yapılarının SE yapılarından daha büyük olmaları nedeni ile tam olarak kaplanamaması ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle tüm denemelerde daha yoğun yapıda bulunan % 3 oranındaki sodyum çözeltisinin kullanımına karar verilmiştir.

Sentetik tohum denemeleri için hem globuler hem de torpedo aşamasında bulunan somatik embriyo yapıları kullanılmıştır. İlk gözlemler 4 hafta sonra alınmaya başlanmış olup son gözlemler deneme kurulduktan sonra 20. haftada alınmıştır. Deneme genelinde *C. persicum* ve *C. graecum* türlerinde bitkiciğe dönüşüm sağlanırken, *C. cilicium* türünde somatik embriyo oluşumu devam etmiştir. *C. coum* türünde ise çimlenen somatik embriyoların yanı sıra yeni somatik embriyoların gelişmeye devam ettiği görülmüştür. Benzer şekilde Sevindik (2018) çalışmasında somatik embriyo yapılarının globuler veya torpedo aşamalarında tutuklu kalarak, çimlenme ortamına aktarıldıktan sonra da embriyo oluşumunun devam ettiğini bildirmiştir.

Uygulamalar arasındaki çimlenme farklılıkları grafik üzerinde, yüzde ve standart sapma değerleri bakımından karşılaştırmalı olarak sunulmuştur (Winkelmann ve ark. 2004). Bunun yanında uygulamalara ait çimlenme bulguları yüzde değerler olarak ayrıca hazırlanmış olan çizelgede yer almaktadır.

4.5.1. *C. persicum* Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları

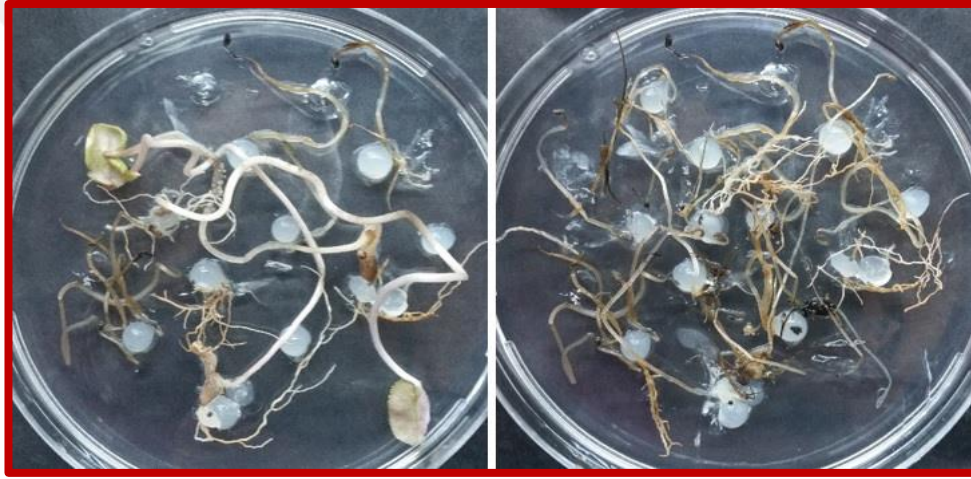
Sentetik tohum denemelerinde en yüksek çimlenme değeri, *C. persicum* türünden elde edilmiştir. Saf su ve MS ortamı ile hazırlanmış olan kalsiyum aljinat kapsüllerinde çimlenme oranı yaklaşık olarak kontrol ile aynı olmuştur. Proline ve spermin ile ($2 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3 + 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA} + 1 \text{ g L}^{-1} \text{ proline} + 0.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ spermin}$ ve $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3 + 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA} + 2 \text{ g L}^{-1} \text{ proline} + 0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ spermin}$) hazırlanan kapsüllerde bu oran % 70'lere kadar yükselmiştir. Haftalara göre değişen çimlenme oranları arasındaki farklılıklar Şekil 4.30'de açıkça görülmektedir.



Şekil 4.30. Enkapsülasyon denemesinde, *C. persicum* türüne ait çimlenme oranlarının haftalık değişimi.

Çizelge 4.32. *C. persicum* türüne ait yüzde çimlenme değerleri

Uygulama	4.hafta	8.hafta	12.hafta	16.hafta	20.hafta
Kontrol	1.7	6.7	11.7	13.3	18.3
Su	1.7	1.7	8.3	10.0	16.7
MS	1.7	5.0	13.3	15.0	20.0
1 mg L ⁻¹ proline	3.3	8.3	20.0	36.7	75.0
2 mg L ⁻¹ proline	3.3	20.0	35.0	53.3	76.7

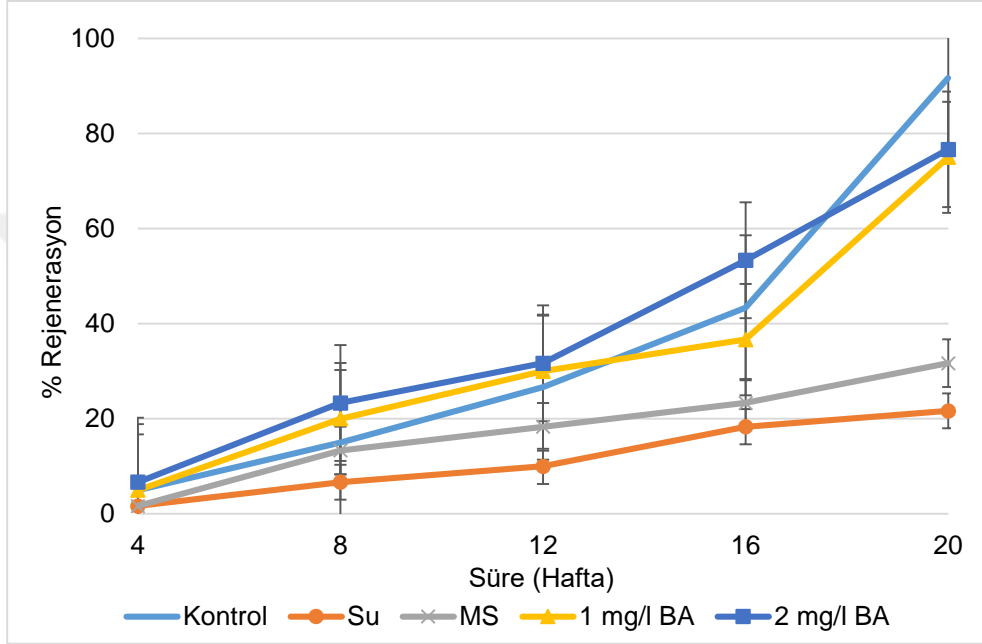
Şekil 4.31. *C. persicum* türünde çimlenen sentetik tohumların görünümü

4.5.2. *C. graecum* Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları

C. graecum türünde sürgün uçları kaplama işlemi için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kaplama ortamının içerisine su ve MS ortamının yanı sıra farklı oranlarda BA (1 ve 2 mg L⁻¹) ve NAA (0.1 mg L⁻¹) ilave edilerek kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar, rejenerasyon gözlenen sürgünlerin % oranları olarak değerlendirilmiş ve hazırlanan grafikte standart sapma ile birlikte sunulmuştur (Şekil 4.32). Buna göre en yüksek rejenerasyon % 92 ile kontrol parselinde gözlenmiştir. Bunun büyük ölçüde kaplama işleminde eksplantların pipet ucundan geçebilmesi

için küçültülmesi aşamasında zarar görmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak ilk haftalardaki gelişim oranları incelendiğinde, hormon ilave edilmiş kaplama materyallerinde gelişimin daha hızlı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.32. Enkapsülasyon denemesinde *C. graecum* türüne ait rejenerasyon oranlarının haftalık değişimi

Çizelge 4.33. *C. graecum* türüne ait yüzde rejenerasyon oranları

Uygulama	4.hafta	8.hafta	12.hafta	16.hafta	20.hafta
Kontrol	5,0	15,0	26,7	43,3	91,7
Su	1,7	6,7	10,0	18,3	21,7
MS	1,7	13,3	18,3	23,3	31,7
1 mg L ⁻¹ BA	5,0	20,0	30,0	36,7	75,0
2 mg L ⁻¹ BA	6,7	23,3	31,7	53,3	76,7



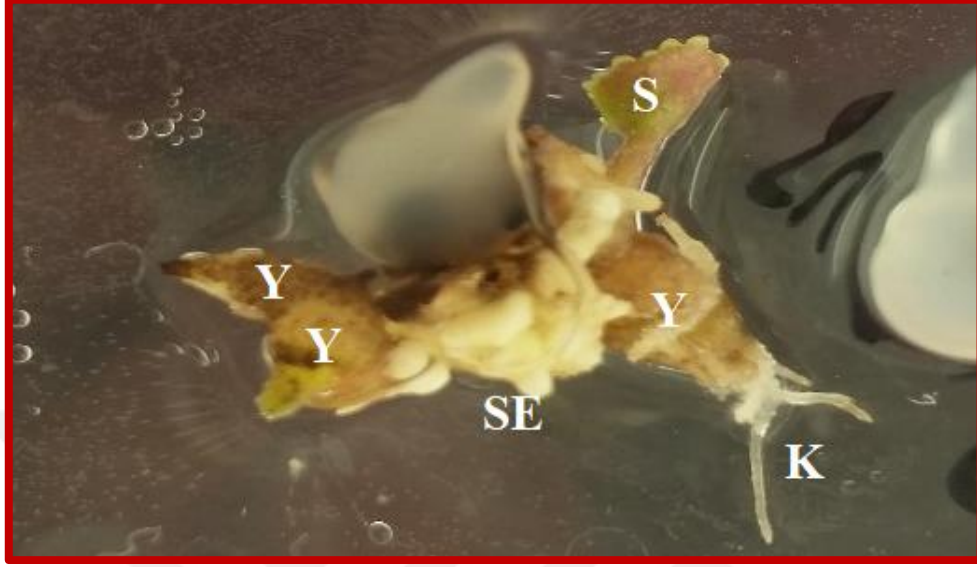
Şekil 4.33. *C. graecum* türünde kaplanmış sürgün uçlarının rejenerasyonu

4.5.3. *C. coum* Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları

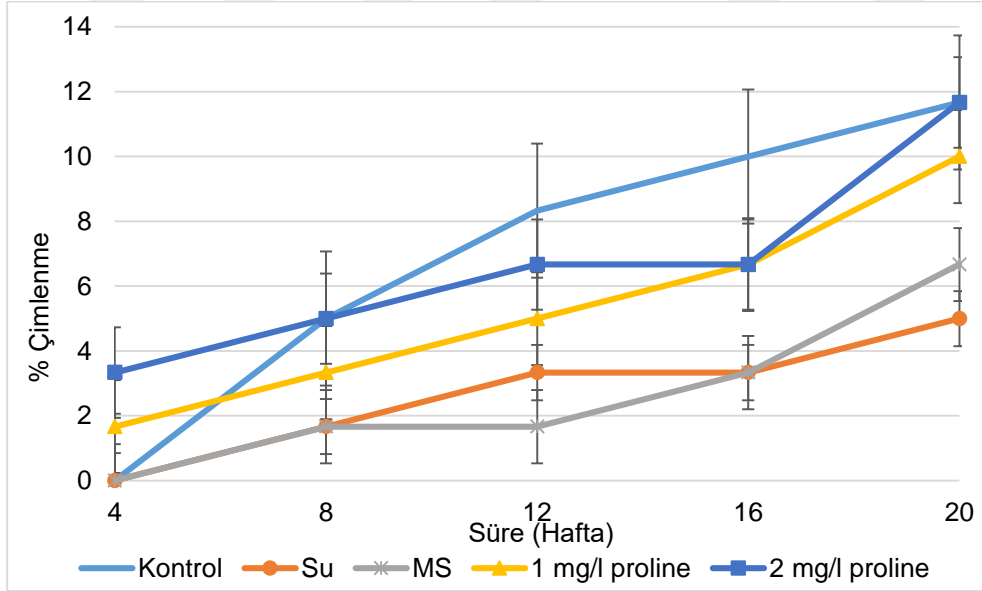
C. coum türünde elde edilmiş olan çimlenme verilerinin, *C. persicum* türüne kıyasla oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında çimlenme denemeleri için BBD içermeyen besi ortamı kullanılmasına karşın, çimlenen bitkicikler üzerinde yeni somatik embriyoların oluşmaya başladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.34).

Çizelge 4.34. *C. coum* türüne ait çimlenme oranları

Uygulama	4.hafta	8.hafta	12.hafta	16.hafta	20.hafta
Kontrol	0,0	5,0	8,3	10,0	11,7
Su	0,0	1,7	3,3	3,3	5,0
MS	0,0	1,7	1,7	3,3	6,7
1 mg L ⁻¹ proline	1,7	3,3	5,0	6,7	10,0
2 mg L ⁻¹ proline	3,3	5,0	6,7	8,3	11,7



Şekil 4.34. *C. coum* türünde çimlenerek bitkiciğe dönüşen somatik embriyo üzerinde gelişmeye başlayan yeni somatik embriyo yapıları. S) Sürgün ve yaprak oluşumu, Y) Somatik embriyoların çimlenmesi ile oluşan yumru yapıları, K) Kök yapısı, SE) Oluşmaya devam eden somatik embriyo yapıları



Şekil 4.35. Enkapsülasyon denemesine *C. coum* türüne ait çimlenme oranlarının haftalık değişimi

C. coum türünde en yüksek çimlenme oranı, kontrol parseli ile birlikte 2 mg L⁻¹ proline kullanımından elde edilmiş olup (% 12) bunu sırası ile 1 mg L⁻¹ proline, MS ve saf su (% 10, % 7 ve % 5) kullanılarak hazırlanmış olan kaplama materyalleri izlemiştir (Şekil 4.35).

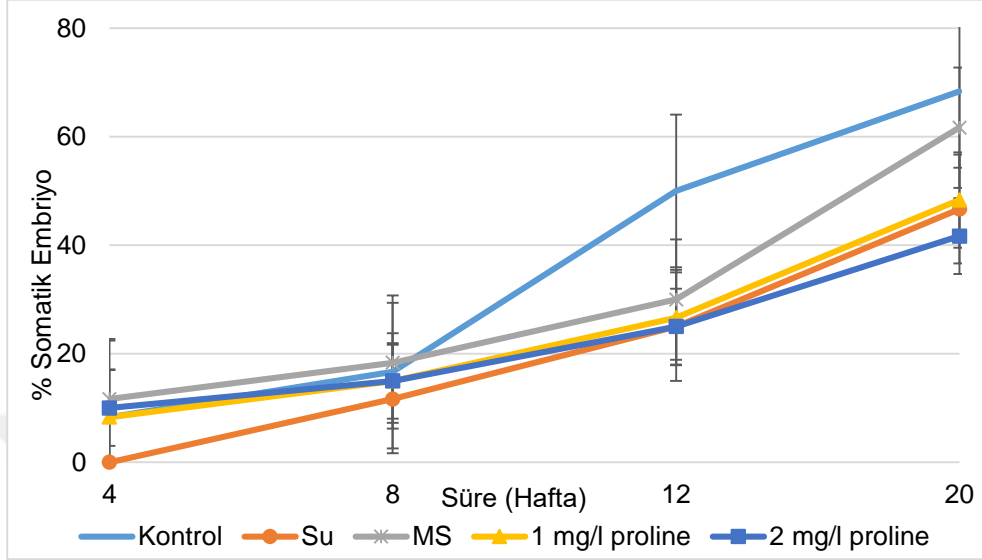
4.5.4. *C. cilicium* Türüne Ait Sentetik Tohum Denemesi Sonuçları

C. cilicium türünde kaplama işleminden sonra kontrol grubu ile birlikte BBD içermeyen ½ MS ortamına ekilen somatik embriyo yapılarından yeni somatik embriyolar gelişmeye devam etmiştir. Buna karşın somatik embriyolarda kök veya sürgün benzeri düzensiz yapılar gözlenirken, tam anlamı ile çimlenerek bitkiciğe dönüşebilen bir embriyonik yapıya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, yapılan gözlemlerde de somatik embriyo üretmeye devam eden eksplantların oranı kaydedilmiştir. Uygulamalar arasında gözlenen farklılıklar, yüzde oranı olarak değerlendirilerek haftalık periyotlar halinde sunulmuştur (Şekil 4.36 ve Çizelge 4.36).

Çizelge 4.35. *C. cilicium* türünde oluşmaya devam eden somatik embriyo oranlarının haftalara göre yüzde değişim değerleri

Uygulama	4.hafta	8.hafta	12.hafta	16.hafta	20.hafta
Kontrol	8,3	16,7	50,0	53,3	68,3
Su	0,0	11,7	25,0	40,0	46,7
MS	11,7	18,3	30,0	50,0	61,7
1 mg L ⁻¹ proline	8,3	15,0	26,7	48,3	48,3
2 mg L ⁻¹ proline	10,0	15,0	25,0	41,7	41,7

Buna göre en fazla somatik embriyo gelişimi kontrol gurubunda (%68) gözlenirken, bunu sırası ile (% 61.7; % 48.3; % 46.7 ve % 41.7 ile) MS, 1 mg L⁻¹ proline, su ve 2 mg L⁻¹ proline kullanılarak gerçekleştirilen kaplamalar izlemiştir.



Şekil 4.36. *C. cilicium* türünde, BBD içermeyen besi ortamında SE rejenerasyonuna devam eden somatik embriyo oranları



Şekil 4.37. *C. cilicium* türünde A) Kontrol gurubu ve B) kaplama yapılan uygulamalarda gelişmeye devam eden SE yapıları



Şekil 4.38. *C. cilicium* türünde kaplama materyalinin içerisinde gelişmeye devam eden somatik embriyo yapılarının yakından görünümü

Enkapsülasyon denemelerinde elde edilmiş olan gözlem sonuçları incelendiğinde, en çok dikkat çeken sonuç türler arasındaki farklılıklardır. En yüksek çimlenme oranı % 76.7 ile *C. persicum* türünde gözlenmiştir. Bu oran aynı zamanda kontrol grubu (% 18.3), saf su (% 16.7) veya MS ortamı (% 20) ilave edilerek kaplanan SE yapılarından oldukça yüksektir. *C. coum* türünde elde edilmiş olan en yüksek çimlenme oranı, % 11.7 olarak tespit edilmiştir. Ancak söz konusu *C. cilicium* türü olunca hiç çimlenmenin gözlenmediği görülmektedir. Siklamen türleri kullanılarak gerçekleştirilen sentetik tohum çalışmaları oldukça sınırlıdır. Ancak elde edilmiş olan bu veriler siklamen türünde yapılan somatik embriyogenesis çalışmaları ile kıyaslandığında, somatik embriyolarda benzer çimlenme problemleri ile karşılaşıldığı (Winkelmann, 2006; Winkelmann, 2016; Sevindik, 2018) ve türler arasında çimlenme oranının *C. persicum* türünde daha yüksek olduğu (Prange ve ark., 2010; Jalali, 2012) ifade edilmektedir. Bu nedenle özellikle endemik türlere ait somatik embriyo yapıların olgunlaştırma ortamında tutulduktan sonra çimlenme ortamına alınması gerektiği belirtilmiştir (Winkelmann, 2015; İzgü ve ark., 2016). Çalışmamızda çimlenmeyi teşvik etmek için kaplama materyaline ilave edilen ortam bileşenleri *C. persicum* türünde önemli şekilde çimlenme oranını artırırken, *C. coum* türünde kontrol ile aynı oranda çimlenme elde edilmiş, *C. cilicium* türünde ise

çimlenme gözlenmemiştir. Bununla birlikte kapsülasyonun çimlenme üzerine olan etkilerini araştıran Winkelmann (2004), besin maddelerinin embriyoya ulaşmasındaki gecikmeden kaynaklanan az bir çimlenme gecikmesi gözlendiğini bildirmiştir.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ana vatanı Akdeniz havzası olan siklamenin Dünya üzerinde 22 farklı türü bulunmaktadır. Ülkemizde *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. coum*, *C. parviflorum*, *C. rephandum*, *C. trochopteranthum*, *C. hederifolium*, *C. cilicium*, *C. mirabile* ve *C. graecum* olmak üzere 10 farklı türü bulunmakta olup bunlardan 6 tanesi endemiktir. Dünyada süs bitkileri sektöründe en çok kullanılan siklamen türü, mevcut ticari çeşitlerin atası olarak bilinen *C. persicum* türüdür. *C. persicum* türünde ıslah çalışmaları klasik melezlemeler ile yapılmakla birlikte bazı siklamen türlerindeki kendileme depresyonu gibi döllenme bozuklukları bu türün ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. *In vitro* üretim siklamen ıslahında rutin olarak kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisidir. Kendileme depresyonu nedeni ile klasik yöntemlerle üretilmeyen ana baba hatlar *in vitro* tekniklerle çoğaltılmaktadır. Bunun yanında mutasyon ıslahı veya heterozigot bireylerin melezlenmesi ile elde edilmiş olan bitkilerin üretimi için mikro çoğaltım önemli bir üretim yöntemidir. Islah ve üretim amaçlı kullanılmasının yanı sıra *in vitro* rejenerasyon çalışmaları, farklı nedenlerle doğanın tahrip edilmesi sonucu tehdit veya geri dönüşü olmayan şekilde yok olma tehlikesi altında bulunan genetik kaynakların muhafazası için oldukça önemlidir. Siklamende somatik embriyogenesis ve organogenesis teknikleri, etkili birer *in vitro* çoğaltma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Erken dönemde gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda yumru parçalarının, diğer bitki organlarına nazaran daha yüksek bir rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen çalışmalarda eksplantın sahip olduğu endojen hormonların rejenerasyon üzerine ekzogen hormonlardan daha etkili olduğuna vurgu yapılmaktadır. Bu nedenle rejenerasyon oranı bakımından ciddi farklılıklar gözlenen eksplantların sahip oldukları endojen hormonlar üzerine detaylı araştırmalar yapılmalıdır. Benzer şekilde, farklı vejetasyon dönemlerindeki eksplantların iç hormon dengeleri incelenerek

rejenerasyon üzerine olan etkileri ortaya konmalıdır. *In vitro* rejenerasyon çalışmalarında özellikle somatik embriyogenesis alanında kallus gelişimi, embriyoya dönüşüm ve SE yapılarının çimlenmesi alanında çalışmalar genişletilerek devam ettirilmelidir.

Çalışmada ele alınan bir diğer konu ise sentetik tohum üretimidir. Doku kültüründe üretilmiş olan somatik embriyo yapılarının (bazen kallus veya sürgün uçlarının) farklı şekillerde kaplanarak sentetik tohumun üretilmesinin amacı vejetatif üretim (üniformite) ile tohumla üretimin (taşıma, depolama, mibzer kullanımı) avantajlarını birleştirmektir. Ayrıca somatik embriyoların çimlenmesini teşvik edici bir takım ilave besi maddeleri ile somatik embriyo üretiminde karşılaşılan en büyük problemlerden biri olan çimlenme probleminin aşılmasına olanak vermektedir.

Tez kapsamında doğal siklamen türlerine ait yumru parçaları farklı vejetasyon dönemlerinde kültüre alınarak somatik embriyo yapıları elde edilmiş ve ardından bu yapılardan enkapsülasyon yöntemi ile sentetik tohumlar üretilerek çimlenme değerleri karşılaştırılmıştır.

Çalışma süresince elde edilmiş olan bulguları şu şekilde sıralamak mümkündür.

- Tez çalışması süresince karşılaşılan en büyük problem yüksek enfeksiyon oranları olmuştur. Soğanlı ve yumrulu bitkilerde % 50'lere kadar çıkabildiği rapor edilen enfeksiyon oranı kuru yakma ve cıva klorür kullanımı ile kısmen azaltılmıştır. Bunu yanında *in vitro* kültür öncesi pestisit kullanımının özellikle fungus kaynaklı bulaşmaları büyük ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte besi ortamına ilave edilen antibiyotik veya PPM™ çözeltisi bakteri kaynaklı enfeksiyon gelişimlerini önleme konusunda yetersiz kalmış ve alt kültürler boyunca endojen bakterilerin ortaya çıkışı devam etmiştir. Sterilizasyon işlemi için, aktif korür oranı kesin olarak bilinmeyen

sodyum hipoklorit yerine konsantrasyonu tam olarak ayarlanabilen hidrojen peroksit veya kalsiyum hipoklorit kullanımı sterilizasyon başarısını arttıracaktır.

- Farklı dönemlerde kurulmuş olan denemelerde, dinlenme döneminde bulunan yumruların daha yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, dinlenme döneminde, yumruların sahip olduğu besin ve endojen hormon seviyelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, farklı dönemlerdeki yumruların endojen hormon ve besin içeriklerinin karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Bu şekilde rejenerasyonu etkileyen içsel nedenler daha açık bir şekilde ortaya konulabilecektir.
- Çalışmada kullanılan farklı türler aynı ortam koşullarına oldukça farklı tepkiler vermiştir. Bunun yalnızca genotip etkisinden değil, kültür odası koşullarından da ileri geldiği düşünülmektedir. Bu türlerin doğal yetiştirme koşulları göz önüne alındığında, kültür odası koşullarının bu türlerin doğal ortamlarına uygun olacak şekilde düzenlenerek rejenerasyon oranlarının artırılacağı düşünülmektedir.
- Farklı genotiplerin bir arada kültüre alındığı denemelerde ortaya çıkan genotip etkisi açıkça gözlenmiştir. Aynı besi ortamı bileşenleri kullanılarak aynı kültür odasında gelişimlerini devam ettiren *C. graecum* türüne ait eksplantlardan bir kısmı yalnızca kallus oluştururken, diğerinde sürgün oluşumları elde edilmiştir. Bu farklılığa neden olan etmenler gerek genetik gerekse epigenetik olarak incelenmelidir.
- Denemelerde farklı genotiplerin bir arada kullanılması elde edilen veriler arasında büyük farklılıklar olmasına yol açmıştır. Bu nedenle özellikle organogenesis için etkili dozun tespit edilmesi mümkün olmamıştır. Kurulacak olan çalışmalarda mümkün olduğunca aynı

genotipe sahip bireyler veya ticari çeşitler tercih edilerek genotip etkisi en aza indirilmelidir.

- Somatik embriyoların elde edildiği BBD konsantrasyonları incelendiğinde, önceki çalışmalar ile paralel olduğu görülmektedir. Ancak elde edilen rejenerasyon oranları oldukça düşüktür. Bir genotipten somatik embriyo elde edilebilmesi, o genotipin SE potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ancak bu oranın çok düşük olmasına, kullanılan yumruların yaşlı olmasının neden olduğu düşündürmektedir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş veya üretilmiş genç fidelere ait dokuların tercih edilmesi daha uygun olacaktır. Bunun için ticari türlere ait F1 tohumlar veya mikro çoğaltım ile klonlanmış aynı genotipe sahip bireyler tercih edilebilir.
- Sentetik tohum üretiminde kaplama materyaline ilave edilen proline, spermin GA₃'ün çimlenme üzerine olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, *C. persicum* türüne ait SE yapılarının çimlenmesi üzerine etkili olan ortam bileşenlerinin, *C. coum* ve *C. cilicium* türü üzerine aynı derecede etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu türler için kaplama materyaline farklı büyüme düzenleyiciler ilave edilerek, sentetik tohum çalışmalarının geliştirilmesi gerekmektedir.
- Sentetik tohum çalışmalarında kullanılan yöntemlerin direkt olarak *in vivo* koşullara ekim yapılacak şekilde geliştirilmesi gerekmektedir.
- Sentetik tohumun taşıma ve depolama avantajlarından tam olarak yararlanabilmek için, kaplanmış somatik embriyoların depolama ömrünü arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmalıdır.
- Son olarak, somatik embriyogenesis çalışmalarının tamamında ortaya çıkan genotipler arası farklılığın gerçekleştirilecek olan moleküler çalışmalarıyla aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Qaoud, H., 2004. Direct Regeneration in *Cyclamen Persicum* Mill. Using Seedling Tissues. An-Najah Univ. J. Res. (N.Sc.), Vol. 18 (2)
- Addam, K., Mohammad, H., Bou-Hamdan, M., Takkoush, J., Rifai, F., 2017. *Cyclamen persicum* f. *puniceum* (Gleason) Grey-Wilson New Plant Record Joined the Lebanese Flora. International Journal of Botany Studies, 2, 4, 12-15.
- Aka Kaçar, Y., Darıcı, C., Söğüt, Z., Bozdoğan, E., Haspolat, G., Teixeira da Silva, J. A., 2013. Türkiye’ de Doğal Olarak Yetişen *Cyclamen* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve In Vitro Muhafazası. Tübitak Projesi Sonuç Raporu, Proje No: 110O102. Mayıs 2013, Adana
- Al-Majathoub, M., Karam. N. S., 2000. *In vitro* propagation of wild *Cyclamen persicum* Mill. form seedling tissue. Acta Horticulturae 530, ISHS 2000
- Ando, T., Murasaki, K., 1983. *In vitro* propagation of *Cyclamen* by the use of etiolated petioles. Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ. Vol.32, pg1-5
- Anonim, 2017. Süs Bitkileri Sektör Raporu, Haziran 2017. Süs Bitkileri Üreticileri Alt Birliği
- Anonim, 2019. *Cyclamen* mite, University of Florida, http://entnemdept.ufl.edu/creatures/orn/cyclamen_mite.htm (erişim tarihi: 17.12.2019)
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N. Gümüştü, A., 2015. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, 483-507.
- Başaran, E., Aras, S., Cansaran-Duman, D., 2010. Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları. Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi, 67(2): 85-96
- Bian, F., Zheng, C., Qu, F., Gong, X., You, C., 2010. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Plant Mol. Biol. Rep. 28, 22–31.

- Çölgeçen, H., Toker, M. C., 2006. Sentetik Tohum, Review. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, Vol:7, No: 2, s:323-3367
- Çürük, P., 2013. Adana Ve Çevresinde Doğal Olarak Yetişen Siklamen Türlerinin Morfolojik Ve Moleküler Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tez, 216.
- De Souza, T. V., Thiesen, J. F., Guerra, M. P., Santos, M., 2016. Morpho- and histodifferentiation of shoot regeneration of *Billbergia zebrina* (Helbert) Lindley nodular cultures. Plant Cell Tiss. Organ Cult. DOI:10.1007/s11240-016-1061-y
- Dhar, U., & Joshi, M., 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (*Asteraceae*): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Reports, 24(4), 195–200. doi:10.1007/s00299-005-0932-1
- Dillen, W., Dijkstra, I., Oud, J., 1996. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Reports 15:545-548
- Doğan-Kalyoncu D., 2007. Bazı Yabancı *Tulipa* Türlerinde *in vitro* Soğanlık Üretimi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
- Ekim, T., Koyuncu, M., Güner, A., Erik, S., Yıldız, B., Vural, M., 1991. Türkiye'nin ekonomik değer taşıyan geofitleri üzerinde taksonomik ve ekolojik araştırmalar. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, İşletme ve Pazarlama Daire Başkanlığı, O. E. M. Eğitim Dairesi Başkanlığı Yayın ve Tanıtma Şube Müdürlüğü Matbaası, Ankara.
- Engelmann, F., 1997. *In vitro* conservation methods. Biotechnology and Plant Genetic Resources, Conservation and Use. Edited by J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. CAB International, 1997. pg:119-162 ISBN 0 85199 142 4

- Franklin, G., Sheeba, C.J., Lakshmi., G., 2004. Regeneration of Eggplant (*Solanum Melongena* L.) from Root Explants. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 40:188–191, Doi: 10.1079/Ivp2003491 Q 2004 Society For *In Vitro* Biology
- Furukawa, K., Kakihara, F., Kato, M., 2001. Somatic embryogenesis in seven wild *Cyclamen* species. *J. SHITA* 13:270–278. doi:10.2525/jshita.13.270 (orj. Japonca, İngilizce Özetli)
- Furukawa, K., Kakihara, F., Kato, M., 2002. Somatic embryos produced from aseptic seedlings of wild *Cyclamen* species. *J SHITA* 14:71–80
- Geier, T., 1977 Morphogenesis and plant gereneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. *Acta Hortic.* 212: 711 – 714. Doi: 10.17660/ActaHortic.1977.78.20
- Gill, R., Gerrath, J., Saxena, P.,K., 1992. High-frequency Direct Embryogenesis In Thin Layer Cultures Of Hybrid Seed Geranium (*Pelargonium*). *Can. J. Bot.* 71:408-413.
- Gülbağ, F., 2015. Türkiyede Süs bitkileri Islah Çalışmaları. Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi, Türktob, Nisan-Haziran 2015 Sayı:14 S:12-15
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C., 2000. Flora of Turkey and East Aegean Island (Supplament II). *Edinburgh.* Vol.11, 656.
- Gündoğan, M. T., 2003. *Cyclamen mirabile* Hildebr. ve *Cyclamen trochopteranthum* O. Schwarz türleri üzerinde bazı fitokimyasal araştırmalar. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Gürlek, D., 2011. *Fritillaria imperialis* ve *F. persica* Türlerinde *in vitro* Soğancık Üretimi Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Grey-Wilson, C., 2002. *Cyclamen* a guide for gardener, horticulturists and botanists. New and. Bastford, London, p 192

- İzğü, T., Sevindik, B., Çürük, P., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y., Teixeira da Silva, J. A., Mendi, Y. Y., 2016. Development of an efficient regeneration protocol for four *Cyclamen* species endemic to Turkey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(1), 95-113.
- Jalali, N., Naderi, R., Babalar, M., Mirmasoumi, M., 2010. Somatic Embryogenesis in *Cyclamen* with Two Explants and Combinations of Plant Growth Regulators. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 51(5): 445-448
- Jalali, N., Naderi, R., Teixeira da Silva, J.A., Babalar, M., Mirmasoumi, M., 2010. Influence of salt concentration of media and plant growth regulator combination on callus formation and somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. *Floricult Ornam Biotechnol* 4(1):84–87
- Jalali, N., Naderi, R., Shahi Gharahlar, A., Teixeira da Silva, J.A., 2012. Tissue culture of *Cyclamen spp.* *Sci. Hortic.* 137, 11–19.
- Jimnez, V.M., 2001. Regulation of *in vitro* Somatic Embryogenesis with Emphasis on The Role of Endogenous Hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 13(2):196-223, 2001
- Karagüzel, Ö., Kaya, A. S., Aydınşakir, K., 2007. Dünyada ve Türkiye’de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu.
- Karam, N. S., Al-Majathoub, M., 2000a. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *Scientia Hort.* 86 (2000) 235-246. doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00146-1
- Karam, N. S., Al-Majathoub, M., 2000b. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Scientia Horticulturae* 86, 323 – 333
- Koçak, M., İzgü, T., Sevindik, B., Tütüncü, M., Çürük, P., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y., Teixeira da Silva, J.A., Yalçın Mendi, Y., 2014. Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill. *Scientia Horticulturae*. Vol. 172, 9 June 2014, P: 26-33 DOI: doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.044
- Koyuncu, M., 1994. “Geofitler” Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayını, Cilt 27; Sayı 321, Pro- Mat Basın Yayını A. Ş., Ankara.

- Kreuger, M., Postma, E., Brouwer, Y., van Holst G.J., 1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium. *Physiologia Plantarum* 94: 605-612.
- Loewenberg, J. R., 1969 *Cyclamen* callus culture. *Can. J. Bot.* 47(12): 2065-2067.
- Marinangeli, P. (2016). Somatic Embryogenesis of *Lilium* from Microbulb Transverse Thin Cell Layers. *Methods in Molecular Biology*, 387–394. doi:10.1007/978-1-4939-3061-6_19
- Mathew, B., Özhatay, N., 2001. Türkiye'nin Siklamenleri. Türkiye Doğal Hayatı Koruma Derneği, Sirkeci, İstanbul, s32
- Mayer, L., 1956. Wachstum und Organbildung an *in vitro* kultivierten Segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. *Planta* 47, p. 401–446
- Mohannad, A.,M., Karam, N.,S., 2000. *In Vitro* Propagation of Wild *Cyclamen persicum* Mill. from Seedling Tissue. *Acta Hort.* 530, 243-252 DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.530.29
- Murasaki, K., Tsurushima, H., 1988. Improvement on clonal propagation of *Cyclamen in vitro* by the use of etiolated petioles. *Acta Horticulturae* 226,1988
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473–497
- Mutun, S., 2016. Review of oak gall wasps phylogeographic patterns in Turkey suggests a main role of the Anatolian diagonal. *Turkish Journal of Forestry*, 17(Special Issue): 1-6. DOI: 10.18182/tjf.65861
- Naderi, R., Jalali, N., Babalar, M., Mirmasoumi, M. 2012. Estimate of callus induction and somatic embryogenesis in cyclamen. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. IJACS/2012/4-11/699–702
- Nhut, D.T., Thu, H. T. M., Vinh, B. V. T., Binh, N. V., Luan, V. Q., 2012. Thin cell layer technology in regeneration and micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. *Propagation of Ornamental Plants*. Vol. 12, No 2, 2012: 89-95

- Nongalleima, K., Singh, T.D., Amitabha, D., Deb, L., Devi, S., 2013. Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season. *Biological Rhythm Research*, Doi: 10.1080/09291016.2013.818196
- Okumoto, H., Takabayashi, S., 1969. Aseptic culture of *Cyclamen* tuber tissue. Effects of curing, mode of inoculation and temperature on development of explant and percentage of microbial infection. *Jour. Japan. Soc. Hort. Sci.* 38 (2): 178-187
- Otani, M., Shimada, T., 1991. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from *Cyclamen persicum* Mill. Leaf Cultures. *Plant Tissue Culture Letters*, 8(2): 121-123
- Prange, A.N.S., Serek, M., Winkelmann, T., 2008. Vegetative propagation of different *Cyclamen* species via adventitious shoot formation from seedling tissue. *Propagation of Ornamental Plants* 8(4): 2004-2009
- Prange, A.N.S., Serek, M., Bartsch, M., Winkelmann, T., 2010a. Efficient and stable regeneration from protoplast of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 101:171-182 DOI 10.1007/s11240-010-9674-z
- Prange, A.N.S., Bartsch, M., Serek, M., Winkelmann, T., 2010b. Regeneration of different *Cyclamen* species via somatic embryogenesis from callus, suspension cultures and protoplasts. *Sci. Hortic.* 125:442-450. doi:10.1016/j.scienta.2010.04.018
- Read, P.R., Preece, J.E., 2009. Micropropagation of Ornamentals: the wave of the future. *Acta. Hortic.* 812,51-62
- Sevindik, B., İzgü, T., Tütüncü, M., Mendi, Y., Y., 2019. III International Symposium on Plant Cryopreservation. *Acta Hortic.* 1234. ISHS 2019. Eds.:K. Thammaviri et al. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1234.3

- Sevindik, B., 2018. Siklamende Anter Ve Ovül Kültürü Yöntemleri İle Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Seyring, M., Ewald, A., Muller, A., Haensch, K. T., 2009 Screening for propagation suitability in vitro of different *Cyclamen* species. Electron J Biotechnol 12:4–7. doi:10.4067/S0717-34582009000400010
- Seyring, M., Hohe, A., 2005. Induction of desiccation – tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 80 (1) 65 – 69
- Stichel, E., 1959. Gleichzeitige induktion von sprossen und wurzeln an in vitro kultivierten gewebestücken von *Cyclamen persicum*. Planta 53, 293-317
- Schwenkel, H. G., Winkelmann, T., 1998. Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 4: 28-34.
- Tagipur, E. M., Seker, G., Teixeira da Silva J. A., Yalçın-Mendi Y., 2016. Somatic Embryogenesis, Cryopreservation and In vitro Mutagenesis in *Cyclamen*. A. Mujib(ed.) Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications.
- Takamura, T., Miyajima, I., Matsuo, E., 1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. ‘Anneke’ from aseptic seedlings. Plant Cell Rep. 15, 22–25.
- Tekin, A. & ALP, A., 2017. Gıda Bilimi, Issue 51, pp. 21-36.
- Tanker, M., Tanker, N., 1985. Farmakognozi. Cilt I, II, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Yayın No.58
- Teixeira da Silva, J.A., 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12), pp. 683-691, Dec.2006
- Teixeira da Silva, J.A., 2016. *Cyclamen* caulogenesis, rhizogenesis and microtuberization. Modern Phytomorphology 10: 3–10, 2016. ISSN 2226-3063 e-ISSN 2227-9555

- Resmi Gazete, 2016. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında: Doğal Çiçek Soğanlarının 2016 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2015/47. 17 Ocak 2016 Pazar, Sayı: 29596
- Vidalie, H. 1995. *In Vitro* Culture and Its Applications In Horticulture. Science Publishers, Inc. ISBN : 188610607X
- Wicart, G., Mouras, A., Lutz, A., 1984. Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Tissue culture: evidence for a single organogenesis pattern. *Protoplasma* 119: 159–167.
- Winkelmann, T., Hohe, A., Schwenkel H.-G., 1998. Establishing embriyogenic suspension cultures in *Cyclamen persicum* ‘Purple Flamed’. *Advances in Horticultural Science* 12 (1998): 25-30
- Winkelmann, T., Meyer, L., Serek, M., 2004a. Desiccation of somatic embriyoos of *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79 (3) 479 – 483
- Winkelmann, T., Meyer, L., Serek, M., 2004b. Germination of Encapsulated Somatic Embryos of *Cyclamen persicum*. *Hort Science* 39(5):1093 – 1097
- Winkelmann, T., Serek, M., 2005. Genotypic differences in callus formation and regeneration of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Euphytica* 144:109–116. doi:10.1007/s10681-005-5038-x
- Winkelmann, T., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Serek, M., Braun, H.P., 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 224, 508–519.
- Winkelmann, T., 2010. Clonal Propagation of *Cyclamen persicum* via Somatic Embryogenesis. *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology*, vol. 589 Eds: S.M. Jain and S.J. Ochatt. DOI 10.1007/978-1-60327-114-1_26.
- Winkelmann, T., Ratjens, S., Bartsch, M., Rode, C., Niehaus, K., Bednarz, H., 2015. Metabolite profiling of somatic embryos of *Cyclamen persicum* in

comparison to zygotic embryos, endosperm, and testa. *Front Plant Sci* 6:597. doi:10.3389/fpls.2015.00597

Winkelmann, T., 2016. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*, vol. 1359, DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6_2 © Springer Science

Yamaner, O., Erdag, B., 2008. Direct shoot formation and microtuberization from aseptic seedlings of *Cyclamen mirabile* Hildebr. *Biotechnology* 7:328–332

Yang, X., Zhang, X., 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci*. 29:36–57



ÖZGEÇMİŞ

Denizli’de, 1981 yılında doğdu. İlk ve orta öğreniminin ardından Denizli Anafartalar Lisesinden mezun oldu. Lisans eğitimini İzmir’de, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde 2004 yılında tamamladı. The Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Horticultural Genetics and Biotechnology bölümünde 2005-2006 öğrenim yılında, bir yıl süreyle eğitim gördü. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri ABD doku kültürü alanında yüksek lisans eğitimini tamamladı.





EKLER



Ek 1. *C.persicum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki farklılıklar

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD
0.5 + 0.1	78.5 d (65.43)	80 abcd (72.00)	79.25 cd (68.72)	30 fgh (32.78)	16 hi (15.46)	23 hi (24.12)	10 hij (11.89)	8 ij (7.84)	9 gh (9.869)	2 hi (2.656)	0 i (0.00)	1 ef (1.328)
0.5 + 0.3	98 ab (87.34)	77 cd (67.15)	87.5 abc (77.24)	34 fgh (35.20)	11.33 hi (15.44)	22.67 ghi (25.32)	0 j (0.00)	7.33 hij (10.13)	3.67 h (5.066)	0 i (0.00)	0 i (0.00)	0 f (0.00)
0.5 + 0.5	92 abcd (79.37)	76 cd (66.68)	84 bcd (73.03)	42 ef (40.15)	17 ghi (19.15)	29.5 fghi (29.65)	20 ghi (23.67)	0 j (0.00)	10 gh (11.83)	10 efghi (11.89)	0 i (0.00)	5 def (5.95)
0.5 + 0.8	74 cd (66.92)	44 e (41.31)	59 e (54.11)	40 fg (38.89)	8 i (7.84)	24 i (23.36)	34 efg (31.03)	12 hij (10.15)	23 efg (20.59)	30 defg (25.49)	0 i (0.00)	15 cdef (12.74)
1 + 0.1	90 abcd (81.00)	95 abcd (84.00)	92.5 abc (82.50)	54 def (47.42)	8 i (10.62)	31 fghi (29.0)	64 bc (54.91)	9 hij (11.31)	36.5 cde (33.11)	34 cde (30.81)	0 i (0.00)	17 cde (15.40)
1 + 0.3	84 abcd (77.31)	48 e (40.84)	66 de (59.07)	40 fgh (36.00)	0 i (0)	20 i (18.00)	42 cdefg (40.15)	0 j (0.00)	21 efg (20.07)	8 fghi (9.236)	0 i (0.00)	4 def (4.62)
1 + 0.5	96 abc (86.07)	76 cd (66.68)	86 abc (76.38)	57 cdef (49.15)	4 i (5.31)	30.5 fghi (27.2)	28 fgh (28.62)	0 j (0.00)	14 gh (14.31)	42 bcd (38.65)	0 i (0.00)	21 cd (19.32)
1 + 0.8	100 a (90.00)	36 e (30.68)	68 de (60.34)	68 abcd (61.73)	20 ghi (18.00)	44 efg (39.8)	30 gh (27.00)	0 j (0.00)	15 gh (13.50)	32 cde (31.04)	0 i (0.00)	16 cde (15.52)
1.5 + 0.1	100 a (90.00)	80 abcd (72.00)	90 abc (81.00)	84 ab (71.52)	4 i (5.31)	44 efgh (38.42)	38.5 defg (35.19)	0 j (0.00)	19.25 fgh (17.59)	58 bc (51.34)	0 i (0.00)	29 bc (25.67)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	96 abcd (84.68)	98 a (87.34)	66 abcde (60.58)	77.33 abcd (67.48)	71.67 abc (64,03)	36 defg (33,58)	52 bcde (49,15)	44 bcd (41.36)	32 defg (25.37)	28 defg (25.62)	30 bc (25.49)

Ek 1'in devamı

1.5 + 0.5	96 abc (86.07)	92 abcd (82.15)	94 ab (84.11)	88 a (74.06)	79.43 ab (71.66)	83.71 ab (72.86)	26 gh (27.35)	74.29 ab (65.53)	50.14 bc (46.44)	66 ab (57.68)	28 defg (25.84)	47 a (41.76)
1.5 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	92 a (79.37)	81.33 abc (69.78)	86.67 a (74.58)	54 bcdef (47.30)	84 a (74.30)	69 a (60.80)	86 a (75.57)	0 i (0.00)	43 ab (37.78)
2 + 0.1	90 abcd (81.00)	100 a (90.00)	95 ab (85.50)	56 cdef (50.07)	72 abcd (67.16)	64 bcd (58.61)	44 cdefg (38.30)	64 abc (56.53)	54 ab (47.42)	38 cd (33.23)	52 bcd (43.37)	45 ab (38.30)
2 + 0.3	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	54 def (47.42)	34.93 fgh (35.84)	44.46 ef (41.6)	27.33 ghi (25.33)	59.36 bcd (50.41)	43.35 bcd (37.87)	32 def (26.76)	4 ghi (5.313)	18 cde (16.03)
2 + 0.5	98 ab (87.34)	92 abcd (82.15)	95 ab (84.74)	55.5 cdef (49.73)	58.29 bcdef (53.07)	56.89 cde (51.4)	27 ghi (25.26)	36.57 efg (31.01)	31.79 def (28.14)	66 ab (55.15)	36 cde (30.68)	51 a (42.92)
2 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	58.2 cdef (49.91)	42 ef (40.15)	50.1 de (45.0)	35 defg (31,50)	71 ab (60,46)	53 bc (45.98)	56 bc (48.68)	24 defgh (23.31)	40 ab (36.00)
Toplam Dönem	93.53 a (83.61)	80.75 b (71.89)	87.14 (77.76)	57.42 a (51.50)	33.35 b (31.39)	45.39 (41.45)	32.24 (30.07)	29.85 (26.68)	31.04 (28.38)	37 a (32.72)	10.75 b (9.63)	23.88 (21.18)
	LSD _{BBD} =14.303; ***LSD _{Dönem} =5.057; ***LSD _{BBD} *Dönem=20.228; (p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =14.778; ***LSD _{Dönem} =5.225; ***LSD _{BBD} *Dönem=20.899; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =13.415; LSD _{Dönem} =Ö.D.; ***LSD _{BBD} *Dönem=18.971; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =15.056; ***LSD _{Dönem} =5.521; ***LSD _{BBD} *Dönem=21.292; (***p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek.2. *C.persicum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki farklılıklar

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam BBD
0.5 + 0.1	72.67 def (60.26)	80 bcde (72.00)	76.33 def (66.13)	22 def (22.15)	8 fg (7.846)	15 h (15.00)	7.33 jkl (8.83)	8 jkl (7.84)	7.67 b (8.342)	2 ij (2.65)	0 j (0)	1 h (1.328)
0.5 + 0.3	74 cde (62.41)	77 cde (67.15)	75.5 def (64.78)	36 cde (30.68)	0 g (0.00)	18 h (15.34)	8 jkl (9.23)	7.4 jkl (10.18)	7.7 b (9.709)	2 ij (2.65)	0 j (0)	1 h (1.328)
0.5 + 0.5	88.83 abcde (76.00)	100 a (90.00)	94.42 abc (82.99)	41.84 cd (40.15)	9 efg (11.31)	25.42 efgh (25.73)	15.66 ghijkl (19.61)	0 l (0.00)	7.83 b (9.807)	11 ghij (9.57)	0 j (0)	5.5 fgh (4.788)
0.5 + 0.8	74 cde (66.92)	44 fg (41.31)	59 f (54.11)	52 bc (47.65)	0 g (0.00)	26 fgh (23.82)	14 ijkl (14.42)	12 jkl (10.15)	13 b (12.28)	24 defgh (23.31)	0 j (0)	12 efgh (11.65)
1 + 0.1	80 bcde (67.71)	95 ab (84.00)	87.5 abcd (75.85)	30 cdef (27.00)	8 efg (10.62)	19 gh (18.81)	28 efghij (25.62)	4 kl (5.31)	16 b (15.46)	0 j (0.00)	0 j (0)	0 h (0.00)
1 + 0.3	84 abcde (77.31)	48 fg (40.84)	66 ef (59.07)	46 cd (39.68)	0 g (0.00)	23 gh (19.84)	16 hijkl (15.69)	0 l (0.00)	8 b (7.846)	8 ghij (7.84)	0 j (0)	4 gh (3.923)
1 + 0.5	90 abcd (79.49)	80 abcde (72.00)	85 bcd (75.74)	44.67 cd (41.71)	0 g (0.00)	22.33 gh (20.85)	23.67 fghijk (23.06)	0 l (0.00)	11.83 b (11.53)	39 bcdef (36.81)	0 j (0)	19.5 def (18.40)
1 + 0.8	100 a (90.00)	24 g (23.31)	62 ef (56.65)	54 c (44.52)	0 g (0.00)	27 fgh (22.26)	20 ghijkl (18.00)	0 l (0.00)	10 b (9.000)	22 fghij (17.76)	0 j (0)	11 fgh (8.882)
1.5 + 0.1	90 abc (81.00)	64 ef (59.31)	77 cde (70.15)	74 ab (66.92)	0 g (0.00)	37 defg (33.46)	40 bcdefgh (36.11)	0 l (0.00)	20 b (18.05)	26 efghi (21.68)	0 j (0)	13 efgh (10.84)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	96 ab (84.68)	98 ab (87.34)	84 a (73.03)	48 c (43.84)	66 b (58.43)	36 cdefghi (33.58)	44 bcdef (41.31)	40 a (37.44)	12 ghij (10.15)	28 cdefgh (25.62)	20 defg (17.88)
1.5 + 0.5	96 ab (86.07)	100 a (90.00)	98 ab (88.03)	82.33 a (69.11)	88 a (79.84)	85.17 a (74.48)	27.67 efghij (28.37)	68.6 a (62.19)	48.13 a (45.28)	55.33 ab (48.29)	28 cdefg (25.84)	41.67 abc (37.06)

Ek 2'nin devamı

1.5 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	90.33 a (76.96)	86.6 a (79.01)	88.47 a (77.98)	53 abcd (46.73)	64 ab (56.30)	58.5 a (51.51)	52 ab (49.15)	0 j (0)	26 cde (24.57)
2 + 0.1	90 abc (81.00)	100 a (90.00)	95 ab (85.50)	49 cd (43.03)	72 ab (67.16)	60.5 bc (55.09)	57 abc (50.65)	48 abcdef (43.62)	52.5 a (47.13)	43.67 bcde (39.67)	52 abcd (43.37)	47.83 ab (41.52)
2 + 0.3	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	52.33 c (45.01)	26.9 cdef (27.98)	39.62 def (36.49)	52 abcde (46.15)	46.8 abcdef (42.97)	49.4 a (44.56)	50.67 abc (43.89)	4 hij (5.31)	27.33 cde (24.60)
2 + 0.5	98 a (87.34)	100 a (90.00)	99 ab (88.67)	76 ab (66.68)	34.2 cde (29.48)	55.1 bcd (48.08)	50 abcde (45.00)	46.2 bcdef (36.85)	48.1 a (40.92)	72 a (61.37)	36 bcdef (30.68)	54 a (46.03)
2 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	41.33 cd (38.37)	47 cd (43.15)	44.17 cde (40.76)	45.66 abcdef (43.72)	63 ab (55.62)	54.33 a (49.67)	41.33 bcde (38.37)	24 defgh (23.31)	32.37 bcd (30.84)
Toplam Dönem	89.84 a (79.72)	81.75 b (73.41)	85.79 (76.569)	54.74 a (48.29)	26.73 b (25.02)	40.74 (36.66)	30.88 a (29.05)	25.75 b (23.27)	28.32 (26.16)	28.81 a (25.82)	10.75 b (9.63)	19.78 (17.73)
	LSD _{BBD} =13.740; *LSD _{Dönem} =4.857; ***LSD _{BBD} *Dönem=19.431; (*p<0.05; ***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =15.042; ***LSD _{Dönem} =5.318; ***LSD _{BBD} *Dönem=21.273; (p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =14.618; *LSD _{Dönem} =5.168; **LSD _{BBD} *Dönem=20.673; (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =14.414; ***LSD _{Dönem} =5.096; **LSD _{BBD} *Dönem=20.385; (**p<0.01; ***p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 3. *C. graecum* türüne ait birinci çiçeklenme dönemi yumru bölgeleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge
0.5 + 0.1	44 cdef (38.30)	40 def (36.00)	42 (37.15)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	8 ij (10.62)	20 hij (18.00)	14 fg (14.31)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)
0.5 + 0.3	52 abcdef (48.93)	40 cdef (39.00)	46 (43.96)	6.67 (9.64)	0 (0)	3.33 bc (4.82)	32 cdefghij (34.16)	8 ij (10.62)	20 efg (22.39)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)
0.5 + 0.5	96 a (84.68)	72 abcde (61.37)	84 (73.03)	4 (5.31)	4 (5.31)	4 bc (5.31)	72 abc (64.38)	16 hij (15.69)	44 bcde (40.03)	4 (5.3)	0 (0)	2 bc (2.65)
0.5 + 0.8	76 abcd (69.69)	68 abcdef (55.83)	72 (62.76)	4 (5.31)	4 (5.31)	4 bc (5.31)	44 bcdefghi (41.31)	68 abcdef (55.83)	56 abc (48.57)	0 (0)	4 (5.3)	2 bc (2.65)
1 + 0.1	84 abc (74.30)	48 cdef (43.62)	66 (58.96)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	16 hij (18.47)	4 j (5.31)	10 g (11.89)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
1 + 0.3	72 abcde (61.37)	24 f (23.31)	48 (42.34)	16 (12.69)	4 (5.31)	10 bc (9.00)	52 abcdefgh (46.38)	8 ij (10.62)	30 cdefg (28.50)	8 (7.8)	0 (0)	4 bc (3.92)
1 + 0.5	76 abcd (69.69)	64 abcdef (59.31)	70 (64.51)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	24 ghij (23.78)	28 fghij (25.62)	26 defg (24.46)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
1 + 0.8	40 ef (33.22)	48 cdef (43.84)	44 (38.53)	4 (5.31)	0 (0)	2 c (2.65)	76 ab (69.69)	64 abcde (59.31)	70 a (64.50)	4 (5.3)	0 (0)	2 bc (2.65)
1.5 + 0.1	52 cdef (46.38)	96 a (84.68)	74 (65.53)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	20 ghij (23.78)	20 ghij (23.78)	20 efg (23.78)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)

Ek 3'ün devamı

1.5 + 0.3	56abcdef (48.68)	36 ef (30.46)	46 (39.57)	4 (5.31)	0 (0)	2 c (2.65)	24 ghij (23.78)	24 ghij (23.78)	24 efg (23.31)	4 (5.3)	0 (0)	2 bc (2.65)
1.5 + 0.5	36 def (33.69)	88 ab (76.84)	62 (55.26)	8 (7.85)	24 (20.31)	16 ab (14.07)	32 defghij (31.15)	68 abcd (61.84)	50 abc (46.50)	4 (5.3)	12 (13.1)	8 b (9.23)
1.5 + 0.8	48 cdef (43.84)	88 abc (74.30)	68 (58.95)	4 (5.31)	8 (10.63)	6 bc (7.96)	48 bcdefghi (41.06)	84 ab (71.52)	66 ab (56.29)	4 (5.3)	4 (5.3)	4 bc (5.31)
2 + 0.1	64abcdef (59.31)	64abcdef (56.30)	64 (57.81)	12 (10.15)	36 (36.25)	24 a (23.20)	32 efghij (28.37)	40 cdefghij (32.99)	36 cdefg (30.68)	8 (7.8)	24 (26.3)	16 a (17.08)
2 + 0.3	52 cdef (43.37)	84 abc (74.30)	68 (58.84)	0 (0)	8 (10.63)	4 bc (5.31)	40 cdefghij (32.99)	52 abcdefgh (46.38)	46 bcde (39.68)	0 (0)	4 (5.3)	2 bc (2.65)
2 + 0.5	64 abcdef (59.31)	64 abcdef (53.52)	64 (56.42)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	24 fghij (26.31)	52 abcdefgh (46.38)	38 bcdef (36.34)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
2 + 0.8	60abcdef (54.00)	88 ab (76.84)	74 (65.42)	0 (0)	0 (0)	0 c (0)	60 abcdefg (54.00)	88 a (76.84)	74 a (65.42)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
Toplam Bölge	60.75 (54.3)	63.25 (55.58)	62 (54.94)	3.92 (4.18)	5.5 (5.86)	4.71 (5.02)	37.75 (35.59)	40.25 (36.51)	39 (36.05)	2.25 (2.64)	3 (3.46)	2.63 (3.05)
	LSD _{BBD} =Ö.D.; LSD _{Bölge} =Ö.D.; *LSD _{BBD} *Bölge=36.413; (*p<0.05 düzeyinde önemli)		***LSD _{BBD} =2.621.; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD} *Bölge=Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =22.468; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD} *Bölge=Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =7.578; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD} *Bölge=Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 4. *C. graecum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oranı %			Sürgün oranı %			Kök oranı %			Bitkicik oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD
0.5 + 0.1	64 bcdefgh (56.3)	20 jk (18)	42 d (37.15)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	8 hi (10.62)	20 efghi (18)	14 f (14.3)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
0.5 + 0.3	40 fghik (41.78)	52 defghik (46.15)	46 bcd (43.96)	6.67 cde (9.64)	0 e (0)	3.3 cd (4.82)	16 defghi (21.25)	24 defghi (23.53)	20 ef (22.4)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
0.5 + 0.5	92 abc (79.37)	76 abcdefg (66.68)	84 a (73.03)	8 cde (10.63)	0 e (0)	4 cd (5.31)	40 bcdefghi (36.22)	48 bcdef (43.84)	44 cde (40)	4 bc (5.31)	0 c (0)	4 bc (2.66)
0.5 + 0.8	80 abcdef (72)	64 bcdefghi (53.52)	72 abc (62.76)	8 cde (10.63)	0 e (0)	4 cd (5.31)	56 bcd (51.46)	56 bcde (45.68)	56 abcd (48.57)	4 bc (5.31)	0 c (0)	4 bc (2.66)
1 + 0.1	84 abcde (74.3)	48 efghik (43.62)	66 abcd (58.96)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	16 efghi (18.47)	4 i (5.313)	10 f (11.89)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
1 + 0.3	76 abcdefg (66.68)	20 jk (18)	48 cd (42.34)	20 bc (18)	0 e (0)	10 bc (9)	48 bcdef (43.84)	12 fghi (13.15)	30 def (28.5)	8 bc (7.85)	0 c (0)	4 bc (3.92)
1 + 0.5	100 a (90)	40 ghik (39)	70 abc (64.5)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	4 i (5.313)	48 bcdefg (43.62)	26 ef (24.45)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
1 + 0.8	64bcdefg hi (53.52)	24 ijk (23.53)	44 d (38.53)	4 de (5.31)	0 e (0)	2 cd (2.66)	40 bcdefgh (39)	100 a (90)	70 ab (64.5)	4 bc (5.31)	0 c (0)	4 bc (2.66)
1.5 + 0.1	96 ab (84.68)	52 defghij (46.38)	74 ab (65.53)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	20 defghi (23.78)	20 defghi (23.78)	20 ef (23.79)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)

Ek 4'ün Devamı

1.5 + 0.3	76 abcdefg (66.46)	16 k (12.68)	46 d (39.57)	4 de (5.31)	0 e (0)	2 cd (2.66)	32 bcdefghi (33.93)	16 ghi (12.68)	24 ef (23.31)	4 bc (5.31)	0 c (0)	4 bc (2.66)
1.5 + 0.5	88 abcd (76.84)	36 hijk (33.69)	62 abcd (55.26)	32 b (28.15)	0 e (0)	16 ab (14.07)	68 abc (61.84)	32 cdefghi (31.15)	50 abcd (46.5)	12 b (13.16)	0 c (0)	6 b (6.58)
1.5+0.8	76 abcdefg (66.68)	60 cdefghi (51.22)	68 abcd (58.95)	12 cd (15.94)	0 e (0)	6 bcd (7.97)	56 bcde (48.68)	76 ab (63.9)	66 abc (56.3)	8 b (10.63)	0 c (0)	4 bc (5.31)
2 + 0.1	80 abcdefg (68.99)	48 defghij (46.62)	64 abcd (57.81)	48 a (43.62)	0 e (0)	24 a (21.81)	40 bcdefghi (36)	32 defghi (25.37)	36 def (30.69)	28 a (28.85)	0 c (0)	14 a (14.43)
2 + 0.3	80 abcdefg (68.99)	56 cdefghij (48.68)	68 abcd (58.84)	8 cde (10.63)	0 e (0)	4 cd (5.31)	36 bcdefgh (36.47)	56 bcde (48.68)	46 bcde (42.58)	4 bc (5.31)	0 c (0)	4 bc (2.66)
2 + 0.5	80abcdef (72)	48 fghik (40.84)	64 abcd (56.42)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	36bcdefg h (36.69)	40bcdefg hi (36)	38 cde (36.35)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
2 + 0.8	100 a (90)	48 fghik (40.84)	74 ab (65.42)	0 e (0)	0 e (0)	0 d (0)	100 a (90)	48bcdefg h (40.84)	74 a (65.42)	0 c (0)	0 c (0)	0 c (0)
Toplam Genotip	79.75 a (70.54)	44.25 b (39.34)	62 (54.94)	9.42 a (9.87)	0 b (0)	4.71 (4.93)	38.5 (37.1)	39.5 (35.35)	39 (36.22)	4.75 a (5.44)	0 b (0)	2.37 (3.05)
	***LSD _{BBD} =22.579; ***LSD _{Genotip} =7.982; ***LSD _{BBD*Genotip} =31.931		***LSD _{BBD} =8.614; ***LSD _{Genotip} =3.046; ***LSD _{BBD*Genotip} =12.183			***LSD _{BBD} =21.975; LSD _{Genotip} =Ö.D.; ***LSD _{BBD*Genotip} =31.079			***LSD _{BBD} =7.241; ***LSD _{Genotip} =2.560; ***LSD _{BBD*Genotip} =10.240			
***p<0.001 düzeyinde önemli. Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açış transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkikicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 5. *C. graecum* türüne ait ilk yıl dinlenme dönemi yumru bölgeleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge	alt	üst	Toplam Bölge
0.5 + 0.1	92 (79.37)	92 (79.37)	92 a (79.37)	0 (0)	4 (5.313)	2 (2.656)	0 (0)	4 (5.31)	2 d (2.66)	0 (0)	4 (5.31)	2 d (2.65)
0.5 + 0.3	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	68 (56.06)	36 (36.47)	52 (46.26)	48 (43.84)	12 (15.93)	30 abcd (29.89)	40 (36)	20 (20.77)	30 abcd (28.39)
0.5 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	48 (40.84)	44 (41.31)	46 (41.07)	20 (21)	20 (18)	20 bcd (19.50)	32 (28.37)	32 (25.37)	32 abcd (26.87)
0.5 + 0.8	100 (90)	96 (84.68)	98 a (87.34)	24 (20.53)	44 (38.3)	34 (29.42)	12 (13.15)	20 (20.77)	16 cd (16.96)	24 (20.53)	40 (32.99)	32 abcd (26.76)
1 + 0.1	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	16 (18.47)	12 (13.15)	14 (15.81)	60 (54)	28 (25.84)	44 abc (39.92)	4 (5.31)	0 (0)	2 d (2.65)
1 + 0.3	40 (36)	60 (54)	50 b (45.00)	8 (7.846)	4 (5.313)	6 (6.579)	4 (5.313)	28 (25.84)	16 cd (15.57)	8 (7.84)	0 (0)	4 cd (3.92)
1 + 0.5	80 (72)	88 (79.84)	84 a (75.92)	16 (15.69)	36 (30.68)	26 (23.19)	32 (28.37)	44 (38.53)	38 abc (33.45)	16 (15.6)	32 (28.15)	24 cd (21.9)
1 + 0.8	100 (90)	96 (84.68)	98 a (87.34)	52 (43.37)	20 (18)	36 (30.68)	48 (40.84)	48 (43.84)	48 abc (42.34)	60 (54)	20 (18)	40 ab (36.00)
1.5 + 0.1	100 (90)	92 (82.15)	96 a (86.07)	8 (10.62)	20 (21)	14 (15.81)	20 (18)	60 (54)	40 abc (36.00)	4 (5.313)	4 (5.313)	4 cd (5.31)
1.5 + 0.3	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	60 (54)	40 (32.99)	50 (43.49)	44 (38.3)	60 (54)	52 ab (46.15)	60 (54)	56 (48.68)	58 a (51.34)
1.5 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	40 (32.99)	24 (20.53)	32 (26.76)	60 (51.22)	28 (22.84)	44 abc (37.03)	20 (18)	24 (20.53)	22 cd (19.2)

Ek 5'in devamı

1.5 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	20 (18)	40 (36)	30 (27)	60 (54)	60 (54)	60 a (54.00)	24 (23.31)	52 (43.37)	38 ab (33.34)
2 + 0.1	100 (90)	96 (84.68)	98 a (87.34)	20 (21)	32 (28.15)	26 (24.57)	52 (49.15)	28 (22.84)	40 abc (36.00)	16 (15.69)	28 (25.84)	22 cd (20.7)
2 + 0.3	100 (90)	92 (82.15)	96 a (86.07)	32 (28.15)	12 (13.15)	22 (20.65)	64 (59.31)	40 (36)	52 ab (47.65)	48 (40.84)	12 (10.15)	30 abcd (25.49)
2 + 0.5	100 (90)	64 (59.31)	82 a (74.65)	32 (28.15)	36 (33.46)	34 (30.81)	32 (28.15)	36 (30.68)	34 abcd (29.42)	32 (28.15)	20 (18)	26 cd (23.0)
2 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	32 (28.15)	28 (22.84)	30 (25.49)	72 (64.15)	44 (38.3)	58 a (51.23)	36 (30.68)	36 (30.68)	36 abc (30.68)
Toplam Bölge	94.5 (84.83)	92.25 (82.55)	93.38 (83.7)	29.75 (26.49)	27 (24.79)	28.38 (25.64)	39.25 (35.55)	35 (31.67)	37.13 (33.61)	26.5 (23.98)	23.75 (20.82)	25.13 (22.41)
	LSD _{BBD} =Ö.D.; LSD _{Bölge} =Ö.D.; *LSD _{BBD*Bölge} =36.413; (*p<0.05 düzeyinde önemli)		***LSD _{BBD} =2.621.; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD*Bölge} =Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)				***LSD _{BBD} =22.468; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD*Bölge} =Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =7.578; LSD _{Bölge} =Ö.D.; LSD _{BBD*Bölge} =Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 6. *C. graecum* türüne ait ilk yıl dinlenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L-1) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Genotip	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Genotip	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Genotip	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Genotip
0.5 + 0.1	88 bc (74.06)	96 ab (84.68)	92 abc (79.37)	4 ij (5.313)	0 j (0)	2 g (2.656)	4 jk (5.31)	0 k (0)	2 f (2.66)	4 f (5.313)	0 f (0)	2 e (2.65)
0.5 + 0.3	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	80 ab (66.21)	24 efgh (26.31)	52 a (46.26)	48 cdefg (43.84)	12 hijk (15.93)	30 cde (29.89)	44 de (38.30)	16 ef (18.47)	30 b (28.39)
0.5 + 0.5	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	80 ab (66.21)	12 ghij (15.93)	46 abc (41.07)	40 defgh (39.00)	0 k (0)	20 def (19.50)	64 bcd (53.75)	0 f (0)	32 b (26.87)
0.5 + 0.8	96 ab (84.68)	100 a (90.00)	98 a (87.34)	60 bcd (50.99)	8 hij (7.846)	34 bcde (29.42)	32 efghi (33.93)	0 k (0)	16 ef (16.96)	64 bcd (53.52)	0 f (0)	32 b (26.76)
1 + 0.1	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	20 fghi (21.00)	8 hij (10.62)	14 efg (15.81)	80 abc (69.22)	8 ijk (10.62)	44 abc (39.92)	4 f (5.313)	0 f (0)	2 e (2.65)
1 + 0.3	100 a (90.00)	0 d (0)	50 c (45.00)	12 ghij (13.15)	0 j (0)	6 fg (6.579)	12 hijk (13.15)	20 ghijk (18.00)	16 ef (15.57)	8 f (7.846)	0 f (0)	4 de (3.92)
1 + 0.5	100 a (90.00)	68 c (61.84)	84 bc (75.92)	52 bcde (46.38)	0 j (0)	26 de (23.19)	60 bcdef (51.22)	16 hijk (15.69)	38 bcde (33.45)	48 cd (43.84)	0 f (0)	24 bc (21.92)
1 + 0.8	96 ab (84.68)	100 a (90.00)	98 a (87.34)	72 abc (61.37)	0 j (0)	36 bcd (30.68)	76 abc (66.68)	20 ghijk (18.00)	48 abc (42.34)	80 ab (72.00)	0 f (0)	40 ab (36.00)
1.5 + 0.1	100 a (90.00)	92 ab (82.15)	96 ab (86.08)	28 defg (31.63)	0 j (0)	14 efg (15.81)	72 abcd (64.15)	8 ijk (7.846)	40 abcd (36.00)	8 f (10.62)	0 f (0)	4 cde (5.31)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	84 a (74.30)	16 ghij (12.68)	50 ab (43.49)	84 ab (74.30)	20 ghijk (18.00)	52 abc (46.15)	100 a (90.00)	16 f (12.68)	58 a (51.34)

Ek 6'nın devamı

1.5 + 0.5	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	64 bc (53.52)	0 j (0)	32 cde (26)	80 abc (66.21)	8 ijk (7.846)	44 abcd (37.03)	44 de (38.53)	0 f (0)	22 bcde (19.26)
1.5 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	60 abc (54.00)	0 j (0)	30 cde (27)	100 a (90.00)	20 ghijk (18.00)	60 a (54.00)	76 abc (66.68)	0 f (0)	38 b (33.34)
2 + 0.1	100 a (90.00)	96 ab (84.68)	98 a (87.34)	52 bcd (49.15)	0 j (0)	26 de (24.57)	64 bcde (56.30)	16 hijk (15.69)	40 abcd (36.00)	44 de (41.53)	0 f (0)	22 bcd (20.76)
2 + 0.3	100 a (90.00)	92 ab (82.15)	96 ab (86.08)	44 cdef (41.31)	0 j (0)	22 def (20.65)	100 a (90.00)	4 jk (5.31)	52 abc (47.65)	60 bcd (50.99)	0 f (0)	30 b (25.49)
2 + 0.5	100 a (90.00)	64 c (59.31)	82 c (74.66)	64 abc (56.30)	4 ij (5.313)	34 bcd (30.81)	56 bcdef (48.68)	12 ijk (10.15)	34 cde (29.42)	52 cd (46.15)	0 f (0)	26 b (23.07)
2 + 0.8	100 a (90.00)	100 a (90.00)	100 a (90.00)	60 bcd (50.99)	0 j (0)	30 de (25.49)	84 ab (74.30)	32 fghij (28.15)	58 ab (51.23)	72 bcd (61.37)	0 f (0)	36 b (30.68)
Toplam Genotip	98.75 (2.64)	88 (3.46)	93.38 (3.05)	52.25 a (46.36)	4.5 b (4.92)	28.38 (25.64)	62 a (55.39)	12.25 b (11.83)	37.13 (33.61)	48.25 a (42.86)	2 b (1.94)	25.13 (22.41)
	***LSDBBD=10.977; ***LSDGenotip=3.881; ***LSDBBD*Genotip=15.52 4; (**p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSDBBD=14.490; ***LSDGenotip=5.123; ***LSDBBD*Genotip=20.49 2; (**p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSDBBD=18.793; ***LSDGenotip=6.644; ***LSDBBD*Genotip=26.57 8; (**p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSDBBD=17.177; ***LSDGenotip=6.073; ***LSDBBD*Genotip=24.29 1; (**p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 7. *C. graecum* türüne ait ikinci çiçeklenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L-1) 2,4-D + 2iP	Kallus Oranı %			Sürgün Oranı %			Kök Oranı %			Elde Edilen Bitkicik Oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Doz	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Doz	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Doz	Genotip 1	Genotip 2	Toplam Doz
0.5 + 0.1	60 (54)	80 (68.99)	70 ef (61.49)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	8 fgh (7.85)	4 gh (5.31)	6 g (6.57)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
0.5 + 0.3	72 (64.15)	92 (79.37)	82 bcde (71.76)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	24 efgh (23.31)	12 fgh (13.15)	18 defg (18.23)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
0.5 + 0.5	76 (66.68)	92 (79.37)	84 bcde (73.03)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	28 defg (28.62)	4 gh (5.313)	16 efg (16.96)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
0.5 + 0.8	68 (61.84)	88 (76.84)	78 cde (69.34)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	32 cdef (33.93)	0 h (0.00)	16 efg (16.96)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
1 + 0.1	93.33 (82.94)	96 (84.68)	94.67 abcd (83.81)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	7.33 fgh (10.13)	0 h (0.00)	3.66 g (5.06)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
1 + 0.3	92 (82.15)	100 (90)	96 ab (86.07)	0 f (0.00)	4 ef (5.31)	2 d (2.65)	12 fgh (13.15)	20 fgh (18.00)	16 fg (15.57)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
1 + 0.5	92 (82.15)	96 (84.68)	94 abcd (83.42)	0 f (0.00)	8 ef (10.62)	4 d (5.31)	60 bcde (51.22)	16 fgh (15.69)	38 bcdef (33.45)	0 (0)	8 (10.63)	4 bc (5.31)
1 + 0.8	96 (84.68)	96 (84.68)	96 abc (84.68)	4 ef (5.31)	32 bcd (28.37)	18 bc (16.84)	76 ab (66.68)	20 fgh (18.00)	48 abc (42.34)	0 (0)	20 (21.01)	10 ab (10.50)
1.5 + 0.1	52.67 (46.64)	64 (56.53)	58.33 f (51.59)	3.33 ef (4.82)	16 de (15.69)	9.67 cd (10.25)	64.67 bc (57.02)	8 fgh (7.846)	36.33 cdef (32.43)	3.33 (4.82)	12 (13.16)	7.67 abc (8.99)
1.5 + 0.3	60 (54)	80 (68.99)	70 ef (61.49)	12 de (15.93)	48 a (43.62)	30 a (29.78)	76 ab (63.68)	16 fgh (12.68)	46 abc (38.18)	4 (5.31)	28 (28.85)	16 a (17.08)

Ek 7'nin devamı

1.5 + 0.5	66.67 (61.05)	72.67 (61.86)	69.67 ef (61.46)	14.67 de (17.67)	34.67 abc (32.67)	24.67 ab (25.17)	65.33 bc (57.32)	18.66 fgh (17.20)	42 abcd (37.26)	4 (5.31)	22.67 (22.52)	13.33 ab (13.91)
1.5 + 0.8	88 (76.84)	64 (59.31)	76 de (68.07)	4 ef (5.31)	32 bcd (28.37)	18 bc (16.84)	100 a (90.00)	20 fgh (18.00)	60 a (54.00)	4 (5.31)	12 (15.94)	8 ab (10.62)
2 + 0.1	92 (82.15)	96 (84.68)	94 abcd (83.42)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	64 bcd (56.30)	16 fgh (15.69)	40 abcde (36.00)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
2 + 0.3	92 (79.37)	100 (90)	96 abc (84.68)	0 f (0.00)	0 f (0.00)	0 d (0.00)	84 ab (74.30)	8 fgh (10.62)	46 abc (42.46)	0 (0)	0 (0)	0 c (0.00)
2 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90.00)	16 cde (18.47)	42 ab (40.15)	29 a (29.31)	56 bcde (48.68)	35 cdefg (30.00)	45.5 abc (39.34)	4 (5.31)	21 (21.7)	12.5 ab (13.50)
2 + 0.8	96 (84.68)	100 (90)	98 ab (87.34)	8 ef (7.85)	36 ab (36.69)	22 ab (22.27)	88 ab (76.84)	32 defgh (28.15)	60 ab (52.49)	4 (5.31)	20 (21.01)	12 ab (13.15)
Toplam Genotip	81.04 b (72.08)	88.54 a (78.12)	84.79 (75.11)	3.88 b (4.71)	15.79 a (15.09)	9.84 (9.9)	14.35 b (13.48)	52.83 a (47.44)	33.59 (30.47)	1.46 b (1.96)	8.98 a (9.67)	5.22 (5.82)
	***LSD _{BBD} =16.192; *LSD _{Genotip} =5.724; LSD _{BBD} *Genotip=Ö.D.; (*p<0.5; ***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =16.196; ***LSD _{Genotip} =3.720; **LSD _{BBD} *Genotip=14.880; (**p<0.01; ***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =19.928; ***LSD _{Genotip} =7.046; **LSD _{BBD} *Genotip=28.182; (*p<0.5; **p<0.01; ***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =9.351; ***LSD _{Genotip} =3.306; *LSD _{BBD} *Genotip=13.223; (*p<0.5; ***p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek 8. *C. graecum* türüne ait ikinci dinlenme dönemi genotipler arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D + 2iP	Kallus oluşumu %			Sürgün oluşumu %			Kök oluşumu %			Elde edilen bitkicik oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD
0.5 + 0.1	96.66 (85.18)	100 (90)	98.33 a (87.59)	27.14 hijklm (24.97)	42.85 efghijk (37.71)	35 bcde (31.34)	34.28 ghijk (35.51)	55.23 defghi (51.08)	44.76 abcd (43.29)	11.9 hijk (15.72)	18.57 defghij (22.77)	15.23 cde (19.24)
0.5 + 0.3	100 (90)	90 (81)	95 a (85.5)	20 jklmn (18)	13.33 klmn (13.81)	16.66 efg (15.9)	36.66 ghijkl (33.76)	53.33 fghij (44.36)	45 bcde (39.06)	10 ijkl (11.87)	6.67 jkl (9.64)	8.33 e (10.75)
0.5 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	43.33 efghijkl (35.07)	33.33 efghijkl (34.97)	38.33 abc (35.02)	6.66 no (7.05)	50 fghij (45)	28.33 ef (26.02)	20 efghijk (21.15)	20 cdefghi (26.32)	20 bcd (23.74)
0.5 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	15.71 ijklmn (18.33)	32.5 fghijklm (28.44)	24.1 cdef (23.39)	14.76 klmno (14.64)	10 lmno (11.87)	12.38 f (13.25)	12.38 hijk (16.1)	20.83 efghijk (21.37)	16.6 de (18.73)
1 + 0.1	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	46.19 cdefghi (42.38)	37.14 efghijkl (34.71)	41.66 abc (38.55)	49.52 efghij (47.49)	28.57 jklm (29.05)	39.04 bcde (38.27)	13.33 ghijk (16.69)	15.71 efghijk (20.91)	14.52 de (18.8)
1 + 0.3	100 (90)	97.5 (85.85)	98.75 a (87.93)	50 bcdefgh (45.28)	15.83 ijklmn (20.83)	32.91 abcd (33.05)	83.33 abc (73.94)	32.5 hijklm (31.14)	57.91 ab (52.54)	26.66 abcdefg (30.79)	12.5 fghijk (18.59)	19.58 bcd (24.69)
1 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	60 accde (54.28)	30 fghijklm (30.15)	45 ab (42.22)	30 jklmn (27)	29.04 ijklm (29.28)	29.52 def (28.14)	33.33 abcde (35.26)	26.66 bcdefgh (28.21)	30 ab (31.73)

Ek 8'in devamı

1 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	70.47 abc (63.30)	16.66 ijklmn (18.92)	43.57 ab (41.11)	37.61 fghij (37.74)	36.66 fghij (36.92)	37.14 bcde (37.33)	29.04 abcdef (31.98)	16.66 fghijk (18.92)	22.85 abcd (25.45)
1.5 + 0.1	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	75 accd (63.12)	11.42mn (9.82)	43.21abc (36.47)	90 a (81)	8.57mno (8.18)	49.28abc (44.58)	44.16 ab (41.6)	8.57 kl (8.18)	26.36bcd (24.89)
1.5 + 0.3	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	78.57 ab (68.3)	15 jklmn (17.87)	46.78 ab (43.08)	67.61 cdefg (55.61)	72.5 bcdef (58.7)	70.05 a (57.15)	48.57 a (44.17)	9.17 jkl (11.19)	28.86 abcd (27.68)
1.5 + 0.5	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	81.42 a (72.82)	12.5 ijklmn (16.01)	46.96 ab (44.41)	60.95 defgh (51.43)	47.5 fghij (40.68)	54.22 abc (46.05)	35.71 abcd (36.62)	12.5 hijk (16.01)	24.1 abcd (26.31)
1.5 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	73.33 abc (65.23)	9.05 lmn (11.28)	41.19 abc (38.25)	66.66 cdefg (55.59)	66.66 bcdef (58.18)	66.66 a (56.88)	46.66 a (43.05)	9.04 jkl (11.28)	27.85 abcd (27.16)
2 + 0.1	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	75.23 abc (63.48)	36.66 efghijk (36.63)	55.95 a (50.06)	90.47 ab (78.5)	32 hijkl (33.55)	61.23 a (56.03)	32.38 abcde (34.67)	20 defghij (23.74)	26.19 abc (29.2)
2 + 0.3	100 (90)	97.5 (85.85)	98.75 a (87.93)	73.33 accd (62.36)	21.07 hijklmn (21.73)	47.2 ab (42.04)	80 abcd (72)	44.88 fghij (42.47)	62.44 a (57.23)	31.66 abcde (34.21)	15.71 fghijk (18.46)	23.69 abcd (26.33)
2 + 0.5	98.14 (86.75)	100 (90)	99.07 a (88.37)	56.48 accdef (51.4)	27.43 efghijklm (30.95)	41.95 ab (41.18)	78.7 abcde (67.73)	34.37 hijklm (31.29)	56.53 abc (49.51)	48.14 a (43.9)	21.18 bcdefghi (27.2)	34.66 a (35.55)
2 + 0.8	100 (90)	100 (90)	100 a (90)	53.33 accdefg (49.81)	7.5 lmn (12.42)	30.41 bcde (31.12)	36.66 fghij (36.92)	42.5 ghijk (34.85)	39.58 cde (35.89)	40 aabc (39.15)	7.5 ijkl (12.42)	23.75 abcd (25.79)

Ek 8'in devamı

BBD (mg L ⁻¹) IBA + BA)	Kallus oluşumu %			Sürgün oluşumu %			Kök oluşumu %			Elde edilen bitkicik oranı %		
	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD	Genotip 1	Genotip 2	Toplam BBD
0.1 + 0.3	73.33 (62.36)	60 (51.41)	66.66 b (56.88)	40 defghij (39.15)	13.33 jklmn (16.69)	26.66 bcde (27.92)	0 o (0)	0 o (0)	0 f (0)	0 l (0)	0 l (0)	0 f (0)
0.3 + 0.9	76.66 (64.3)	76.66 (67.18)	76.66 b (65.74)	26.66ghi jklm (27.92)	6.66 mn (7.05)	16.66 def (17.48)	0 o (0)	0 o (0)	0 f (0)	0 l (0)	0 l (0)	0 f (0)
0.5 + 1.5	66.66 (58.18)	53.33 (50.1)	60 b (54.14)	16.66 jklmn (16.05)	0 n (0)	8.333 efg (8.03)	0 o (0)	0 o (0)	0 f (0)	0 l (0)	0 l (0)	0 f (0)
0.8 + 2.4	46.66 (39.89)	46.66 (43.05)	46.66 c (41.47)	0 n (0)	0 n (0)	0 g (0)	0 o (0)	0 o (0)	0 f (0)	0 l (0)	0 l (0)	0 f (0)
1.0 + 3.0	13.33 (16.69)	23.33 (22.81)	18.33 d (19.75)	0 n (0)	0 n (0)	0 g (0)	0 o (0)	0 o (0)	0 f (0)	0 l (0)	0 l (0)	0 (0)
Toplam	89.12 (79.69)	87.86 (78.92)	88.49 (79.31)	47 a (41.97)	18 b (19.05)	32.5 (30.51)	41.14 a (36.95)	30.68 b (27.94)	35.91 (32.44)	23.05 a (23.67)	11.49 b (14.06)	17.27 (18.86)
	LSD _{doz} =12.136; LSD _{genotip} =Ö.D.; LSD _{doz*genotip} =Ö.D.; (p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{doz} =17.046; ***LSD _{gen} otip=5.266; ***LSD _{doz*genotip} =24. 106; (**p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{doz} =15.536; ***LSD _{gen} otip=4.799; ***LSD _{doz*genotip} =21. 972; (**p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{doz} =10.238; ***LSD _{genotip} =3.163; ***LSD _{do} z*genotip=14.478; (**p<0.001 düzeyinde önemli)		
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek.9. *C. graecum* türüne ait ilk yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4-D+2iP	Kallus oluşum oranı %			Sürgün oluşum oranı %			Kök oluşum oranı %			Bitkiciğe dönüşüm oranı %		
	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
0.5 + 0.1	92 abcd (79.37)	42 h (37.15)	67 cd (58.26)	2 hi (2.65)	0 i (0.00)	1 d (1.32)	2 (2.66)	14 (14.31)	8 d (8.48)	2 ef (2.65)	0 f (0.00)	1 c (1.32)
0.5 + 0.3	100 a (90.00)	46 fgh (43.96)	73 abc (66.98)	52 a (46.26)	3.33 ghi (4.81)	27.67 a (25.54)	30 (29.89)	20 (22.4)	25 bcd (26.14)	30 bc (28.39)	0 f (0.00)	15 abc (14.19)
0.5 + 0.5	100 a (90.00)	84 abcde (73.03)	92 a (81.51)	46 abc (41.07)	4 ghi (5.31)	25 ab (23.19)	20 (19.5)	44 (40.04)	32 bc (29.76)	32 bc (26.87)	2 ef (2.65)	17 abc (14.76)
0.5 + 0.8	98 ab (87.34)	72 defg (62.76)	85 ab (75.05)	34 abcd (29.42)	4 ghi (5.31)	19 abc (17.36)	16 (16.97)	56 (48.57)	36 bc (32.77)	32 bc (26.76)	2 ef (2.65)	17 abc (14.71)
1 + 0.1	100 a (90.00)	66 defgh (58.96)	83 ab (74.48)	14 defghi (15.81)	0 i (0.00)	7 cd (7.90)	44 (39.92)	10 (11.89)	27 bcd (25.90)	2 ef (2.65)	0 f (0.00)	1 c (1.32)
1 + 0.3	50 fgh (45.00)	48 gh (42.34)	49 d (43.67)	6 fghi (6.57)	10 efghi (9.00)	8 cd (7.78)	16 (15.58)	30 (28.5)	23 d (22.00)	4 def (3.92)	4 def (3.92)	4 c (3.92)
1 + 0.5	84 abcde (75.92)	70 cde (64.50)	77 abc (70.21)	26 cdefg (23.19)	0 i (0.00)	13 bcd (11.59)	38 (33.46)	26 (24.47)	32 bc (82.96)	24 bcde (21.92)	0 f (0.00)	12 bc (10.96)
1 + 0.8	98 ab (87.34)	44 h (38.53)	71 bc (62.93)	36 abcd (30.68)	2 hi (2.65)	19 abc (16.67)	48 (42.34)	70 (64.5)	59 a (53.42)	40 ab (36.00)	2 ef (2.65)	21 ab (19.32)
1.5 + 0.1	96 abc (86.07)	74 bcdef (65.53)	85 ab (75.80)	14 defghi (15.81)	0 i (0.00)	7 cd (7.90)	40 (36.01)	20 (23.79)	30 bc (29.89)	4 def (5.31)	0 f (0.00)	2 c (2.65)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	46 h (39.57)	73 bc (64.78)	50 ab (43.49)	2 hi (2.65)	26 ab (23.07)	52 (46.15)	24 (23.31)	38 bc (34.73)	58 a (51.34)	2 ef (2.65)	30 a (27.00)
1.5 + 0.5	100 a (90.00)	62 efgh (55.26)	81 abc (72.63)	32 bcde (26.76)	16 defghi (14.07)	24 abc (20.42)	44 (37.03)	50 (46.5)	47 ab (41.76)	22 bcdef (19.26)	8 cdef (9.23)	15 abc (14.25)

Ek 9'un devamı

1.5 + 0.8	100 a (90.00)	68 defgh (58.95)	84 ab (74.47)	30 bcde (27.00)	6 efghi (7.96)	18 abc (17.48)	60 (54.01)	66 (56.3)	63 a (55.14)	38 ab (33.34)	4 def (5.31)	21 ab (19.32)
2 + 0.1	98 ab (87.34)	64 defgh (57.81)	81 abc (72.57)	26 bcdef (24.57)	24 cdefg (23.20)	25 ab (23.89)	40 (36.03)	36 (30.69)	38 bc (33.34)	22 bcde (20.76)	16 bcdef (17.08)	19 ab (18.92)
2 + 0.3	96 abc (86.07)	68 defgh (58.84)	82 abc (72.45)	22 defgh (20.65)	4 ghi (5.31)	13 abc (12.98)	52 (47.66)	46 (39.69)	49 ab (43.67)	30 bc (25.49)	2 ef (2.65)	16 abc (14.07)
2 + 0.5	82 abcde (74.65)	64 efgh (56.42)	73 bc (65.53)	34 abcd (30.81)	0 i (0.00)	17 abc (15.40)	34 (29.42)	38 (36.35)	36 bc (23.88)	26 bcd (23.07)	0 f (0.00)	13 bc (11.53)
2 + 0.8	100 a (90.00)	74 cde (65.42)	87 ab (77.71)	30 bcdef (25.49)	0 i (0.00)	15 abc (12.74)	58 (51.23)	74 (65.42)	66 a (58.32)	36 b (30.68)	0 f (0.00)	18 abc (15.34)
Toplam Dönem	93.38 a (83.69)	62 b (54.94)	77.69 (69.32)	28.38 a (25.64)	4.71 b (5.01)	16.55 (15.33)	37.13 (33.61)	39 (36.05)	38.065 (34.83)	25.13 a (22.40)	2.63 b (3.05)	13.88 (12.73)
	LSD _{BBD} =15.444; ***LSD _{Dönem} =5.460; LSD _{BBD} *Dönem=Ö.D.; (p<0.001 düzeyinde önemli)		*LSD _{BBD} =13.464; ***LSD _{Dönem} =4.760; *LSD _{BBD} *Dönem=19.041; (***p<0.001; *p<0.5; düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =18.501; LSD _{Dönem} =Ö.D.; LSD _{BBD} *Dönem=Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			*LSD _{BBD} =14.117; ***LSD _{Dönem} =4.991; *LSD _{BBD} *Dönem=19.966; (***p<0.001; *p<0.5; düzeyinde önemli)			
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkicik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												

Ek.10. *C. graecum* türüne ait ikinci yıl çiçeklenme ve dinlenme dönemleri arasındaki rejenerasyon farklılıkları

BBD (mg L ⁻¹) 2,4- D+2iP	kallus oluşum oranı %			Sürgün oluşum oranı %			Kök oluşum oranı %			Bitkiciğe dönüşüm oranı %		
	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam	Dinlenme	Çiçeklenme	Toplam
0.5 + 0.1	98.33 a (87.59)	70 de (61.49)	84.17 ef (74.54)	35 (31.34)	0 (0)	17.5 bcd (15.67)	44.76 (43.29)	6 (6.579)	25.38 efg (24.93)	15.24 (19.25)	0 (0)	7.62 de (9.62)
0.5 + 0.3	95 a (85.50)	82 cd (71.76)	88.5 def (78.63)	16.66 (15.9)	0 (0)	8.33 d (7.95)	45 (39.06)	18 (18.23)	31.5 defg (28.65)	8.33 (10.76)	0 (0)	4.17 e (5.37)
0.5 + 0.5	100 a (90.00)	84 bcd (73.03)	92 abcde (81.51)	38.33 (35.02)	0 (0)	19.16 bcd (17.51)	28.33 (26.02)	16 (16.96)	22.17 fg (21.49)	20 (23.74)	0 (0)	10 cde (11.87)
0.5 + 0.8	100 a (90.00)	78 d (69.34)	89 bcde (79.67)	24.1 (23.39)	0 (0)	12.05 cd (11.69)	12.38 (13.25)	16 (16.96)	14.19 g (15.11)	16.61 (18.74)	0 (0)	8.31 de (9.36)
1 + 0.1	100 a (90.00)	94.67 ab (83.81)	97.33 abc (86.90)	41.66 (38.55)	0 (0)	20.83 bcd (19.27)	39.04 (38.27)	3.67 (5.066)	21.355 fg (21.66)	14.52 (18.81)	0 (0)	7.26 de (9.40)
1 + 0.3	98.75 a (87.93)	96 a (86.07)	97.38 abc (87.00)	32.91 (33.05)	2 (2.65)	17.45 bcd (17.85)	57.92 (52.54)	16 (15.57)	36.96 bcdrf (34.06)	19.58 (24.7)	0 (0)	9.79 cde (12.34)
1 + 0.5	100 a (90.00)	94 abc (83.42)	97 abcd (86.71)	45 (42.22)	4 (5.31)	24.5 abc (23.76)	29.52 (28.14)	38 (33.45)	33.76 cdefg (30.79)	30 (31.74)	4 (5.31)	17 abc (18.52)
1 + 0.8	100 a (90.00)	96 ab (84.68)	98 ab (87.34)	43.57 (41.11)	18 (16.8)	30.78 ab (28.98)	37.14 (37.33)	48 (42.34)	42.57 abcde (39.84)	22.86 (25.46)	10 (10.5)	16.43 abcd (17.97)

Ek 10'un devamı

1.5 + 0.1	100 a (90.00)	58.33 e (51.59)	79.17 f (70.79)	43.21 (36.47)	9.67 (10.2)	26.44abc (23.36)	49.29 (44.58)	36.33 (32.43)	42.81abc def(38.5)	26.37 (24.89)	7.6 (8.99)	16.99abc d (16.94)
1.5 + 0.3	100 a (90.00)	70 de (61.49)	85 ef (75.74)	46.78 (43.08)	30 (29.7)	38.39 a (36.43)	70.05 (57.15)	46 (38.18)	58.03abc (47.67)	28.87 (27.69)	16 (17.08)	22.44 ab (22.38)
1.5 + 0.5	100 a (90.00)	69.67 de (61.46)	84.83 ef (75.73)	46.96 (44.41)	24.67 (25.1)	35.81 a (34.79)	54.23 (46.05)	42 (37.26)	48.12abc de(41.6)	24.11 (26.32)	13.3 (13.92)	18.71abc (20.11)
1.5 + 0.8	100 a (90.00)	76 d (68.07)	88 cdef (79.03)	41.19 (38.25)	18 (16.8)	29.59 ab (27.55)	66.67 (56.88)	60 (54)	63.34 a (55.44)	27.86 (27.17)	8 (10.63)	17.93 abc (18.89)
2 + 0.1	100 a (90.00)	94 abc (83.42)	97 abcd (86.71)	55.95 (50.06)	0 (0)	27.97abc (25.03)	61.24 (56.03)	40 (36)	50.62abc (46.01)	26.19 (29.21)	0 (0)	13.1 bcd (14.60)
2 + 0.3	98.75 a (87.93)	96 ab (84.68)	97.38abc d (86.30)	47.2 (42.04)	0 (0)	23.6 bcd (21.02)	62.44 (57.23)	46 (42.46)	54.22 ab (49.85)	23.69 (26.34)	0 (0)	11.85cde (13.16)
2 + 0.5	98.89 a (88.05)	100 a (90.00)	99.44 a (89.02)	44.86 (43.22)	29 (29.3)	36.93 a (36.27)	60.97 (53.16)	45.5 (39.34)	53.24abc (46.25)	37.36 (37.23)	12.5 (13.5)	24.93 a (25.36)
2 + 0.8	100 a (90.00)	98 a (87.34)	99 a (88.67)	30.41 (31.12)	22 (22.2)	26.2 ab (26.69)	39.58 (35.89)	60 (52.49)	49.79abc d (44.19)	23.75 (25.79)	12 (13.16)	17.88abc (19.47)
Toplam Dönem	99.36 a (89.18)	84.79 b (75.10)	92.075 (82.15)	39.61 a (36.83)	9.83 b (9.90)	24.72 (23.37)	47.41 a (42.81)	33.59 b (30.46)	40.5 (36.63)	22.83 a (24.86)	5.22 b (5.81)	14.03 (15.34)
	LSD _{BBD} =8.246; ***LSD _{Dönem} =2.915; ***LSD _{BBD*Dönem} =11.661; (p<0.001 düzeyinde önemli)		***LSD _{BBD} =13.347; ***LSD _{Dönem} =4.718; LSD _{BBD*Dönem} =Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =17.022; ***LSD _{Dönem} =6.018; LSD _{BBD*Dönem} =Ö.D. (***p<0.001 düzeyinde önemli)			***LSD _{BBD} =8.678; ***LSD _{Dönem} =3.64; LSD _{BBD*Dönem} =Ö.D.; (***p<0.001 düzeyinde önemli)			
Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Kallus, sürgün, kök ve bitkiklik sütunlarındaki harfler birbirlerinden bağımsızdır.												