

**T.C
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MYROBALAN VE GARNEM
ANAÇLARININ *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ
TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTIMI ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUĞRA ERBAŞ
TEMMUZ 2011**

**Myrobalan ve Garnem Anaçlarının *In Vitro* Doku
Kültürü Teknikleri ile Çoğaltımı Üzerinde
Araştırmalar**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

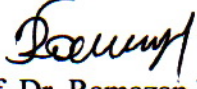
**Danışman
Doç. Dr. Canan Can**

**Buğra Erbaş
Temmuz 2011**

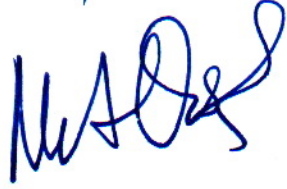
T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Myrobalan ve Garnem Anaçlarının İn Vitro Doku Kültürü Teknikleri İle
Çoğaltımı Üzerinde Araştırmalar
Öğrencinin, Adı Soyadı: Buğra ERBAŞ
Tez Savunma Tarihi: 20/07/2011


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Ramazan KOÇ
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Canan CAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Canan CAN




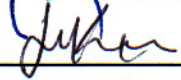

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. Ali ÖZKAN

Yrd. Doç. Dr. H. İbrahim KILIÇ

Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOĞAN

İmzası

ÖZET

MYROBALAN VE GARNEM ANAÇLARININ *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTIMI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Erbaş, Buğra

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Canan Can

Temmuz 2010, 56 sayfa

Bu çalışmada, bodur şeftali anacı Myrabolan 29C ile kayısı ve erik anacı Garnem (GN15) çeşitlerinin *in vitro*'da klonal üretimi üzerinde araştırmalar yapılmıştır. 2-3 yaşındaki anaçların sürgün gözü, yaprak ve petiolleri Gamborg B5 vitaminlerini içeren Murashige ve Skoog (1962)-MS (modifiye MS) ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün teşviki çalışmalarında, Myrobalan 29C sürgün gözlerinde, en yüksek sürgün sayısı (3.00) ve en uzun sürgün gelişimi (18,67 mm) 4 mg l⁻¹ KIN içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. Garnem'de ise sürgün gelişimi saptanmamış olup, kallus meydana gelmiştir. Anaçların yaprak ve yaprak sapı (petiol) eksplantlarında ise kallus oluşumu dışında sürgün gelişimi saptanmamıştır. Kardeşlenme denemelerinde, Myrabolan 29C'nin kültüre alınan her sürgün gözünde ortalama üç kardeş (sürgün) oluşumu saptanmış olup, en yüksek sürgün sayısı (4.778), 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ NAA içeren modifiye MS ortamında, en yüksek sürgün uzunluğu (11.167 mm), 1.0 mg l⁻¹ BAP+1.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IBA içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. Kültüre alınan Garnem sürgün gözlerinde ise kallus ile birlikte birkaç yaprak oluşumu gözlemlenmiştir. Köklenme çalışmalarında kullanılan hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarında, bitkilerde kök oluşumu saptanmamıştır. Garnem'de kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Myrobalan 29C, Garnem, *in vitro*

ABSTRACT

RESEARCH ON PROPAGATION OF MYROBALAN AND GARNEM ROOTSTOCKS WITH IN VITRO TISSUE CULTURE TECHNIQUES

ERBAŞ, B.

M. Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Canan Can

July 2011, 56 pages

In this study research was conducted on *in vitro* clonal propagation of dwarf peach rootstock Myrabolan 29C and almond-plum rootstock Garnem (GN15) varieties. Shoot tip, leaf, and petiole explants from 2-3 years old rootstocks were cultured on Murashige and Skoog media (1962)-MS containing Gamborg B5 vitamins. In shoot inducing experiments, the highest shoot proliferation (3.0) and shoot length (18.67 mm) in Myrabolan 29C occurred in 4 mg l⁻¹ KIN containing modified MS media. Although no shoot proliferation was induced in Garnem, callus development occurred. Leaf and petiole explants of rootstocks failed to induce shoot formation, instead calli were produced. In the case of sibling inducing experiments, average of three offsprings for each shoot tip were generated in Myrabolan 29C, and the highest shoot number (4.778) was obtained in 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ NAA containing modified MS media. The highest shoot length (11.167 mm) formation was induced in 1.0 mg l⁻¹ BAP+1.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IBA containing modified MS media. Calli and leaf formation occurred when the shoot tips of Garnem were cultured. Root inducement experiments on shoot tips of Myrabolan 29C and Garnem explants resulted calli formation.

Key Words: Myrobalan 29C, Garnem, *in vitro*

TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun ve deneysel yöntemlerinin belirlenmesinde, ayrıca sonuçlarının değerlendirilmesinde her türlü yardımını, yönlendirici desteğini, yakın ilgisini ve çok değerli katkılarını gördüğüm tez danışmanım Doç. Dr. Canan CAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bölümümüzün tüm imkanlarından yararlanmamızı sağlayan bölüm başkanımız Prof. Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince çok değerli katkılarda bulunan, deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen ve her zaman manevi destek sağlayan Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOĞAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım için hiçbir desteği esirgemeyen Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsüne, Kamil SARP KAYA ve Agah AKTAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman maddi ve manevi olarak yanımda olup, sevgi ve destekleriyle bana güç veren aileme ve arkadaşlarım Biyolog Gülsüm DOĞANÇAY, Biyolog Özlem SOYLU' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
BÖLÜM 1: GİRİŞ	1
BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ	9
BÖLÜM 3: MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Bitki Materyali	20
3.1.2. Kültür Ortamının Hazırlamasında Kullanılan Kimyasallar	21
3.1.3. Kültür Ortamlarına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri	21
3.1.3.1. Sitokininler	21
3.1.3.2. Oksinler	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması	21
3.2.2. Bitkilerin Sterilizasyonu	22
3.3.3. In vivo' da Gelişen Bitkilerde Mikroçoğaltım	23
3.3.3.1. Sürgün Teşviki	23
3.3.3.2. Kardeşlendirme Çalışmaları	23
3.3.3.3. Köklendirme Çalışmaları	24
3.3.4. İstatistiksel Analiz	24
BÖLÜM 4: BULGULAR	25
4.1. In vivo' da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarından Sürgün Oluşturma Çalışmaları	25

4.2. <i>In vivo</i> 'da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarından Kardeşlendirme Çalışmaları	27
4.3. <i>In vivo</i> 'da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarında Köklendirme Çalışmaları	31
BÖLÜM 5. TARTIŞMA	33
BÖLÜM 6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
EKLER	52
EK 1.	52
EK 2.	53
EK 3.	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Garnem (a,b) ve Myrobalan 29C (c,d) anaçlarının, 2010 Nisan ayında, Gaziantep Üniversitesi Botanik Bahçesindeki görünümü.....	21
Şekil 4.1. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinin KIN ve NAA hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünler.....	27
Şekil 4.2. 2mg l BAP bulunan ortamda kültüre edilen Garnem anacı sürgün gözleri.....	28
Şekil 4.3. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinin Sitokin ve Oksin hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünler.....	30
Şekil 4.4. Garnem anacının sürgün gözlerinin Sitokin ve Oksin hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünler.....	32
Şekil 4.5. Köklenme ortamında kültüre alınan Garnem anacının sürgün gözü eksplantlarında oluşan kalluslar.....	33
Şekil 5.1. MS ortamı üzerinde kültüre alınan eksplantlarda kontaminasyon.....	43

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

- Tablo 4.1.** KIN ve NAA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS modifiye ortamı üzerinde kültüre alınan Myrobalan 29C anacı sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu oranları..... 26
- Tablo 4.2.** KIN, BAP, NAA, IAA, IBA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre alınan Myrobalan 29C anacının sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu oranları..... 29
- Tablo 4.3.** KIN, BAP, NAA, IAA, IBA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre alınan Garnem anacının sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen yaprak sayısı, kardeşlenme ve kallus gelişimi..... 31

SİMGELER VE KISALTMALAR

Atm	Atmosfer basıncı
°C	Santgrad derece
dH ₂ O	Deiyonize su
IAA	Indole-3-asetic acide
BAP	6-Benzylaminopurine
KIN	6-Furfurylaminopurine (Kinetin)
NAA	1-Naphthalene acetic acid
IAA	Indole 3- acetic acide
IBA	Indole 3- butyric acide
FA	Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic (Ferulic acid)
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
BA	6-benzyladenin
TDZ	1-phenyl-3- (1,2,3- Thiadiazol-5-yl) urea (thidiazuron)
2IP	6- (2-isopentyl) adenine
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
GA	Gibberellic acide
PG	Phloroglucinol
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat Penta Hidrat

dH_2O	Deiyonize Su
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Demir Sulfat Heptahidrat
H_3BO_3	Borik Asit
KH_2PO_4	Potasyum Fosfat
KI	Potasyum İyodür
KNO_3	Potasyum Nitrat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sulfat Pentahidrat
$MnSO_4 \cdot H_2O$	Mangan Sulfat
Na_2EDTA	Sodyum EDTA
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum Molibdat Dihidrat
NH_4NO_3	Amonyum Nitrat
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Çinko Sulfat Heptahidrat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Sert çekirdekli meyve türleri (*Prunus* spp.) Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasında bulunan önemli meyve türleridirler (Canlı vd., 2008).

Prunus spp., kiraz, karayemiş, kayısı, şeftali, badem ve erik gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarını içerir. Çiçekleri genellikle pembe ile beyaz renkli, beş taç yaprak ve beş çanak yapraklıdır. Tekli veya iki, altı ya da daha fazla salkımdan oluşan şemsiye çiçek yapısına sahiptir. Meyve bütün türlerde oldukça büyük bir çekirdekten oluşan drupadır. Yapraklar basit, genellikle mızraksı, lopsuz ve yaprak kenarı tamamen dişlidir (www.wikipedia.org).

Ülkemizdeki toplam meyve üretiminin %25'ini sert çekirdekli meyveler oluşturmaktadır ve 2007 yılı itibariyle meyve üretimi 1.963.145 tondur. Bu türler üretim miktarları bakımından dünyadaki diğer üretici ülkelerle karşılaştırıldığında Türkiye; dünya kiraz ve kayısı üretimi bakımından 1. sırada, şeftali ve nektarin üretimi bakımından 7. sırada, erik üretimi bakımından 8. sırada, vişne üretimi bakımından ise 3. sırada yer almaktadır (Arıcı, 2008).

Meyve üretiminde en az 2000 yıldır kullanılan anaçlar genellikle zor köklenen bitkilerin çoğaltımında kullanılmaktadır (Demirsoy ve Macit, 2007). İnsanlar tarımla uğraşmaya başladıklarında daha iri ve iyi kalitede meyve veren ağaçlardan meyve toplamaya dikkat etmişlerdir. İlk meyveciler bu amaçla iri meyve veren ağaçların tohumlarını ekmişler fakat bu şekilde orijinal ağacın özelliklerinin aktarılmadığını görmüşler ve daha sonra istenilen karakterlerin bu ağaçlardan yabani çöğürlere çeşitli şekillerde aşıl yaparak muhafaza edilebileceğini anlamışlardır (Özkarakaş, 2008).

İsmine doğru fidan elde edebilmek için ağaçların tohumla (generatif yol) üretilmemesi gerekir. Bitki organlarından herhangi birini kullanarak (vegetatif yol) çoğaltma yapılmalıdır. Çünkü eşeysiz üremede kök, sürgün, yaprak gibi vegetatif kısımlar yeni bir kök, sürgün sistemi veya bunların her ikisini birlikte oluşturarak

(organogenes) yeni bitki oluşturulur. Böylece eşeyli üremede ana bitkinin genetik yapısında değişme olurken, eşeysiz üremede herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Bu şekilde ana bitkinin bütün özellikleri yavru dölle aktarılmış olur (Özkarakaş, 2008).

Bitkilerin çoğaltımında anaçlar kullanıldığında; anaçların üzerine aşılana çeşidin gelişimi, hastalıklara ve zararlılara dayanımı, verimi, meyve kalitesi, erkenciliği-geççiliği, kurağa, dona tuzluluğa, taban suyuna dayanımı ve bitki besin elementlerinin topraktan alımı etkilenmektedir. Erken meyveye yatma ve birim alandan maksimum ürünü elde edebilmek için klonal anaç kullanmak gerekir. Sert çekirdekli meyvelerin üretiminde kuş kirazı, mahlep çöğürleri, şeftali yozları, badem, kiraz, erik çöğürleri, nema-guard uzun yıllar anaç olarak kullanılmış fakat son yıllarda klon anaçlara olan talep artmıştır. Çöğür anaçlar kalıtım farklılıkları oluşturmaları, kuvvetli büyümeleri ve geç meyveye yatmaları sebebiyle zamanla terk edilmektedir. Klonal anaç kullanımındaysa, genotipin devamlılığı sağlanabilmekte ve gençlik kısırlık dönemi daha kısa sürdüğü için daha erken meyveye yatmaktadır (Arıcı, 2008).

Anaçtan beklenen özelliklerin sürekli artmasının yanında birim alandan yüksek verim almak, ağacı erken meyveye yatırmak ana hedefdir (Demirsoy ve Macit, 2007). Birim alandan en fazla verimi almak için, ağaçları küçülterek birim alana en fazla ağaç dikilmesi sağlanır (Özkarakaş, 2008). Bu amaçla; hedeflerin bazılarını bodur anaçların kullanımıyla ulaşılabilmektedir (Demirsoy ve Macit, 2007). Bodur anaçlar birim alana ekilecek ağaç sayısını artırmakla kalmayıp, erken ürün almayı ve meyve kalitesinin artmasını sağlar. İlaçlama ve hasat gibi bütün uygulamaları kolaylaştırırlar. Kısaca meyve yetiştiriciliğini biraz daha modernleştirirler (Özkarakaş, 2008).

Zor çevre şartlarında, özel adaptasyon yeteneğine sahip ve ekonomik olarak geniş alanda üretilebilen anaçları geliştirmek araştırmacıların ve fidancıların amacıdır (Demirsoy ve Macit, 2007).

Meyve üretiminde gelişmiş ülkelerde de klon anaç kullanımı yaygındır. Küçük taç oluşturan, erken meyveye yatan, aşı uyumsuzluğu göstermeyen, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkiler elde edebilmek için birçok ülkede çalışmalar yapılmaktadır. Bu anaçların doku kültürü yoluyla çoğaltılmasıyla virüsten arı ve zamana bağlı

olmaksızın kısa sürede fazla miktarda anaçlar elde edilebilir. Birçok meyve türünün hızlı ve geniş çaplı üretiminde *in vitro* teknikler kullanılmaktadır (Hepaksoy, 2004).

Anaçta aranan özellikler;

- Çeşidin (kalemin) büyüklüğünü kontrol etmeli,
- Çeşit erken yaşlarda meyve vermeli ve verimliliği artmalı,
- Toprak ve iklim şartlarına adaptasyon yeteneği yüksek olmalı,
- Düşük sıcaklıklara toleranslı olmalı,
- Anaç- kalem uyuşması (aşı uyuşması) iyi olmalı,
- Hastalık ve zararlılara dirençli olmalı,
- Toprağa iyi tutunabilmeli (kök sistemi gelişmiş olmalı),
- Uzun ömürlü olmalı,
- Kolay çoğaltılabilmeli şeklinde belirlenmektedir (Kankaya 1998).

Bunları tohum anaçlarıyla gerçekleştirmek mümkün değildir. Bu amaçları gerçekleştirebilmek için birçok ülkede çalışmalar devam etmektedir. Ülkemizde kamu ve özel sektörlerin ürettiği toplam meyve fidanı üretimi 32.634.924 olup, fidan üretiminin büyük bir çoğunluğu tohumla üretilen çöğür anaçlar üzerinde yapılmaktadır ve klonal anaç kullanılarak meyve fidanı üretimi oldukça azdır ($\approx 1\%$) (Kankaya, 1998).

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra, tarım geliri kullanılarak, toprak ve iklim koşullarının elverişli olduğu hemen hemen tüm ülkelerde, yapılan yatırımlarla tarımsal verimlilikte beklentilerin ötesinde artışlar kaydedilmiştir (www.dpt.gov.tr/planlama). Bitkilerin, insanların ve hayvanların beslenmesinde kullanılması amacıyla geliştirilmesinde iki önemli çalışma göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki 'Yeşil Devrim' olarak adlandırılan, klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer agronomik tekniklerin gelişiminin etkili olduğu dönemdir. İkinci dönem ise 'Gen Devrimi' olarak adlandırılan dönemdir. DNA yapısının anlaşılması, bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devrimi döneminin başlamasını hızlandırmıştır (Babaoğlu vd., 2001).

Ağırlıklı olarak 1970-1980 yılları arasını kapsayan ve ‘Yeşil Devrim’ olarak da adlandırılan büyüme döneminde dünya nüfusunun ortalama yıllık artışı 1.6 iken, tarımsal büyüme %2 seviyelerindedir. Bu oran bilim ve teknik alanındaki ilerlemelerle desteklenen, tarımsal verimlilikteki artış ile gerçekleştirilmiştir. Ekilebilir toprakların sınır seviyesine ulaşıldığı dönemlerde, kontrollü sulama yöntemleriyle yeni hibrit tohumlar ve suni gübrelerin kullanılması, ürün verimini önemli derecede artırmıştır. Bu da gelişmekte olan ülkelerin tarımında köklü değişimler yaratmıştır (www.dpt.gov.tr/planlama). Biyoteknoloji ise 1970’li yılların sonunda genetik mühendislik, hücre kültürü ve hücre füzyonu alanlarında sağlanan gelişmelerin sonucunda yeni bir endüstri olarak ortaya çıkmış, tarımsal alanda “yeşil devrim” olarak adlandırılan değişimi gerçekleştirmede en büyük etken olmuştur (Şahin, 2003).

Biyoteknoloji; hücre ve doku biyolojisi kültürü, mikrobiyoloji, molekülerbiyoloji, moleküler genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimleri yanında mühendislik ve bilgisayar mühendisliğinden yararlanarak, rekombinant DNA teknolojisiyle hayvan, bitki ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya ihtiyacımız kadar üretilmeyen yeni ve az bulunan ürünleri elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Bitki biyoteknolojisi, ‘Doku Kültürü’ ve ‘Genetik Mühendisliği’ olmak üzere 2 ana kola ayrılır. (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay besi ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri ıslah (genetiksel iyileştirme) çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001). Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem, bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu üç kısımda incelenebilir;

- 1) Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon (klonal çoğaltım)

- 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon (organogenesis/somatik embriyogenesis)
- 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon (Babaoğlu vd., 2001).

In vitro kültürün genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajları bulunmaktadır. Bunlar; hastalık ve zararlılardan arı bitkisel materyal eldesi, kitlesel üretimde; üretilen bitkilerde homojenite, klasik yöntemlerden daha kısa kültür süresi, zor üretilen türlerin üretimi, seçilen genotiplerin hızlı üretimi, üretimde az anaç kullanılması, mutasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin elde edilme olasılığıdır (Yalçın Mendi vd., 2008).

Sert çekirdekli meyveler için kullanılan klon anaçlar bitki doku kültürü teknikleri ile veya çelikle çoğaltılmaktadır (Demirsoy ve Macit, 2007). İlk meyvecilikten şu ana kadarki çalışmalarda köklenmesi kolay olan birkaç tür dışında çelikle üretimde başarılı olunamamıştır. 1930'lu yıllarda bitki büyüme düzenleyicilerinin (hormon) bulunuşuyla ancak hız kazanmış ve hormon kullanımıyla bitkilerin köklendirilmesi mümkün olmuştur. Bununla birlikte bazı bitkiler bitki büyüme düzenleyicileriyle bile köklendirilememektedir (Kankaya ve Özyiğit, 1998). Bitki doku kültüründe *in vitro* çoğaltma sağlandıktan sonra, köklendirmek ve köklü bitkilerin aklimatizasyonunu sağlamak önemli bir aşamadır. Özellikle zor köklenen bitkilerin çoğaltım işlemi başarılsa da, köklenme sağlanamamaktadır (Hepaksoy, 2004). Son yıllarda bitki doku kültürü tekniği kullanılarak sert çekirdekli meyve anaçlarında mikroçoğaltım yapılmaktadır (Demirsoy ve Macit, 2007).

Henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden, organize olmuş meristemlerden direk (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus veya protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemlerine mikroçoğaltım denir (Babaoğlu vd., 2001).

Mikroçoğaltım, meyve anaçlarının klonal çoğaltımı için birçok avantaja sahiptir ve rejenerasyonu izleyen transformasyon için önemlidir. Sürgün uçları diğer eksplantlarla kıyaslandığında daha kolay çoğalırlar (Channuntapipat vd., 2003).

Mikroçoğaltımın başarısında kültür ortamının kimyasal kompozisyonunu önemli bir rol oynar. Sub-Optimal kültür ortamları fizyolojik hastalıklara veya ölümlere yol açabilir. Kültür ortamlarının kimyasal kompozisyonları, morfojenik yanıtın bütün tiplerini (aksillar tomurcukların üretimi, bitki rejenerasyonu, embriyogenesis) etkilemektedir. Doku kültürü ortamlarındaki besin elementlerinin etkileşimleri ve bitki büyüme düzenleyicileri (PGRs) daima önemlidir. Murashige ve Skoog, kültür ortamlarını hazırlayabilmek için 5 yıllarını harcamışlardır. Hildebrandt vd., 16.000'den fazla tütün kültürü kullanmış ve ayçiçeği doku uygulaması yapmışlardır. De Fossard vd., kültür ortamlarını geliştirebilmek için bileşenlerinin 81 kombinasyonunu kullanmışlardır. Kültür ortamlarının mineral kompozisyonlarını belirleyen Morard ve Henry ile De Monteiro vd., *in vitro*' da sağlıklı büyüyen bitkilerin yapraklarında ve fidelerin sürgün oluşturan ve köklenen dokularında bulunan mineral oranlarını kullanmışlardır (Nas, 2004).

Myrobalan anaçları (*P. cerasifera*), hızlı büyüyen erik grubundandır. Yaprakları ve meyvesi yeşildir. Derin ve iyi yayılan kök sistemine sahiptir. Ağır ve nemli topraklarda iyi adapte olurlar. Kuvvetli, çok verimli ve uzun ömürlü ağaçlar meydana getirirler. Kültür çeşitleriyle iyi uyuma gösterirler. Çelikleri % 85 oranında köklenmektedir.

Kökeni Kafkasya ve yakınındaki Asya ve Avrupa ülkeleridir. Özellikle Avrupa grubu (*Prunus domestica*) erik çeşitleri için istenen anaç olmakla birlikte Japon grubu (*P. salicina*) erikler içinde uygundur. Yurdumuzda ve Dünya'da geniş ölçüde kullanılan, erik anacıdır. Ancak President ve Kelsey gibi bazı çeşitlerin bu anaç ile tam uyum gösteremediği belirtilmektedir. *P. cerasifera* anaçları ABD ve Avrupa'da Myrobalan erikleri, yurdumuzda ise can eriği olarak tanımlanmaktadır. Değişik toprak ve iklim şartlarına uyabilmektedir. Kök ur nematoduna (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hispanica*) hassas fakat kök boğazı çürüklüğüne dayanıklıdır. Hafif, kumlu topraklarda çok iyi gelişir (Özkarakaş, 2008).

Ülkemizde can erikleri olarak tanınan bu eriklerin en önemli klonları; Myrobalan B, Myrobalan GF 31 ve Myrobalan 29C' dir. Myrobalan anaçları orta büyüklükte ağaçlar yapar. Kök gelişimi ilk yıllarda yüzeyseldir. Fakat güçlü bir kök sistemine sahiptir ve kökler zamanla derinlere inmektedir. Myrobalan 29C, çok iyi aşı uyumu gösterir, erken meyveye yatırır ve oldukça verimlidir (Özkarakaş, 2008).

Garnem (*P. dulcis* x *P. persica*), Kuzey Amerika şeftalisi 'Nemared' ve İspanya bademi 'Garfi' nin İspanya' da çaprazlanmasıyla elde edilen hibrit anaçtır. Bu anaç aslında badem için seçilmiş, şeftali ve nektarin varyeteleri ile de mükemmel aşı uyumu göstermiştir. Garnem (GN 15) anaçları, GF677 anacıyla benzer veya daha güçlü/daha iyi gelişme gösterirler. Büyüme sezonunun ilk sıralarında, tüysüz veya az tüylü yetişirler. Yaprakları, karakteristik olarak badem ve şeftali arasında, büyük ve kırmızıdır. Aşı gözleri ilkbahar, yaz ve kış dönemlerinde iyi performans gösterirler. Badem, nektarin ve şeftalinin bilinen tüm varyetelerinde yüksek derecede sürgün gözü oluşumunu sağlar. Kuraklığa ve verimsiz toprağa karşı toleranttır. Demir klorozisine karşı toleransı GF677 anacından daha düşüktür. Aşırı sulanmış topraklarda asphyxia'ya (asfiksi=oksijensiz kalmak) karşı düşük toleranslıdır. Bu anaca aşıl原因an bitkiler, GF677 anacına yapılan aşılarından daha iyi aşı uyumu gösterirler. Aşırı sürgün gelişimini önlemek için ve meyve büyüklüğü ile kalitesindeki negatif etkiyi azaltmak için yaz budamasına ihtiyaç duyarlar. *Prunus* türlerinde etkili olan kök-ur nematodlarına (*M. arenaria*, *M. hispanica*, *M. incognita* ve *M. Javanica*) karşı dirençlidir. Kök- lezyon nematodu *Pratylenicus vulnus*' a karşı duyarlıdır. Nematod bulunan topraklarda Garnem anacı, GF677 anacı yerine kullanılabilir. Fakat aşırı sulanmış topraklara ve kireçli topraklara direnci GF677 anacından daha düşüktür (www.fitotechniki.com).

Sert çekirdekli meyveler için kullanılan klon anaçları genellikle çelikle ve bazıları da doku kültürleri yolu ile çoğaltılmaktadır. Son yıllarda doku kültürü teknikleri kullanılarak sert çekirdekli meyve anaçlarında mikroçoğaltım yapılmaktadır. Laboratuvar koşullarında sert çekirdekli meyve anaçlarının sürgün uçları ve yan sürgünler BAP (6-Benzylaminopurine) içeren yapay besi ortamlarında kültüre alınarak çoğaltılmaya çalışılmaktadır. Bununla birlikte bazı anaçlar *in vitro*' da seri olarak çoğaltılamamaktadır (Arıcı, 2008). Dünyada klonal bodur anaç kullanılarak fidan üretimi her yıl artmaktadır ve ülkemizde bodur anaç kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle taş çekirdekli meyve ağaçlarında anaç olarak kullanılan çeşitler yurt dışından ithal edilmektedir. İthal yasağının uygulanmaya başlaması ile birlikte, çeşitlerin çoğaltılmasında sorunlar ile karşılaşmaktadır.

Bu çalışmada bodur erik ve kayısı anacı Myrobalan 29C ile şeftali anacı Garnem (GN 15) çeşitlerinin yaprakları, yaprak petiolleri ve sürgün gözleri kullanılarak *in*

vitro' da klonal üretimleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla, Oksin [IAA (Indole 3- acetic acide), IBA (Indole 3-butyric acide), NAA (1-Naphthalene acetic acide)] ve Sitokinin [BAP (6-Benzylaminopurine), KIN (6-Furfurylaminopurine)] hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Meyvelerin çoğaltımında, anaçlar en az 2000 yıldır kullanılmaktadır. Çünkü anaç kullanımı basit bir çoğaltma metodudur. Bunun yanı sıra kalemın büyümesi, ürün kalitesi ve değişik ekolojik şartlara uyum üzerine de etki etmektedir (Demirsoy ve Macit, 2007).

2007 istatistiklerine göre dünyada en çok yetiştirilen sert çekirdekli meyve türü şeftali-nektarindir. Bunu erik, kayısı, kiraz ve vişne izlemektedir. Ülkemizde bu sıralama şeftali-nektarin, kayısı, kiraz, erik ve vişne şeklindedir. Dünya çapında Türkiye kayısı ve kiraz üretimi bakımından 1. sıradadır. Vişne üretimi bakımından ikinci sırada olan ülkemiz dünyada en çok yetiştirilen şeftali-nektarin üretimi bakımından 6. sırada, erik üretimi bakımından 7. sıradadır. Dünya sert çekirdekli meyve türleri üretimindeki artış oranları dikkate alındığında, şeftali-nektarin en önemli artışı göstermiştir (%225,0). Bunu kayısı ve erik (%151,3) ile kiraz (%136,2) ve vişne (%126,4) türleri izlemiştir. Türkiye'deki sert çekirdekli meyvelerin artış oranları, kiraz (%301,5), şeftali-nektarin (%279,1), kayısı (%261,5) ve vişne (%204,3) şeklinde sıralanmıştır. Tüm türlerde Türkiye'nin verim artış oranı, dünyadaki artış oranlarından yüksektir (www.zmo.org.tr).

İlk meyveciler iri ve yüksek kalitedeki ağaçlardan meyveleri toplamışlar ve üretimi bu ağaçların tohumlarından gerçekleştirmişlerdir. Ancak istenilen özelliklerin yavrulara aktarılmadığını görmüşler, bu özelliklerin aşılama yapılarak korunabileceğini fark etmişlerdir. Bitkilerin birçoğunda vegetatif kısımlar yeni bir sürgün sistemi, kök sistemi veya bunların her ikisini birlikte oluşturma yeteneğindedir (totipotensi) ve vegetatif üretimle ana bitkiye benzer bitki oluşturmak mümkündür. Tohumla üretimde ise genetik yapı değişmekte ve bitki ana bitkiye benzemeyip, istenilen özellikleri taşımamaktadır (Özkarakaş, 2008).

Meyve ağaçları vegetatif ve generatif yöntemlerle çoğaltılırlar. Generatif çoğaltmanın materyali tohumdur. Ancak tohumdan elde edilen yavrular genellikle ana bireye tam olarak benzememekte ve istenilen özellikleri taşımamaktadırlar. İstenilen özellikleri taşıyan bitkileri elde etmekte genellikle aşılama yöntemi kullanılır. Bunun içinde kullanılan anaçlar önem kazanmaktadır. Şeftali, badem, kayısı ve erik için değişik toprak tiplerine uygun, hastalık ve zararlılara dayanıklı, kolay çoğaltılabilen, erken yaşta ve bol meyve verme yeteneğine sahip, GF 677, GF 556, Pixy, Marianna GF8-1, Marianna GF 31, Damas GF 1869 ve Saint Julien A gibi anaçlar kullanılmalıdır. Elmada klonal anaç olarak M9 ve MM106 kullanılması, armutta uyuşur çeşitler için, ılıman bölgelerde, Quince A, PQ, BA 29 ve OHxF anaçlarına önem verilmesi gerekmektedir. Kiraz ve vişne için Gisela 5, Tabel/Edabriz, SL 64, MaxMa 14 gibi anaçlar kullanılması uygundur (Kankaya, 1998).

Meyve ağaçları uzun yıllar boyunca çelikle çoğaltılmış ve bugüne kadar köklenmesi kolay olan birkaç meyve türü dışında başarılı olunamamıştır. 1930'lu yıllarda bitki büyüme düzenleyicilerinin (hormon) bulunuşu çelikle çoğaltıma ancak hız kazandırmış ve bitkilerin hormon kullanımıyla köklendirilmesi mümkün olmuştur. Bitkilerin vegetatif üretiminde genellikle IAA (Indole 3- acetic acide), NAA (1-Naphthalene acetic acid), IBA (Indole 3- butyric acide) gibi büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır. Fakat bitki büyüme düzenleyicileri her bitkiye çelikle üretim imkânı veren etkili maddeler değildirler. Ancak çeliklerin köklenme sürelerini kısaltmada ve köklenme oranlarının yükseltilmesinde yardımcı rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte bazı bitkiler büyüme düzenleyicileriyle bile köklendirilememektedir. Elma için anaç olarak kullanılan M9, MM106 ve MM111, ayva ve armut için anaç olarak kullanılan Quince A, erik, kayısı ve şeftali için anaç olarak kullanılabilen Pixy, Marianna GF 8-1, Myrobalan B, Common Mussel, Marianna GF 31, Saint Julien 655-2 ile kiraz klon anaçlarından GM 61/1 ve GM 79' un odun çelikleriyle çoğaltım olanakları araştırılmıştır. Klonal anaçlardan alınan odun çeliklerine 2500 ppm IBA ile muamele edilmiştir. Sera içinde perlit kullanılarak, dışarıda arazi şartlarında çelik dikimleri yapılmıştır. M9, Saint Julien 655-2 ve GM 79' un dışındaki bütün çelikler iyi köklenmiştir (Kankaya ve Özyiğit, 1998).

Aşı vegetatif üretim tekniklerinden biridir. Üretilmesi istenen bitkinin bir parçası (kalem), kökünden faydalanılmak istenen başka bir bitkiyle kaynaştırılarak tek bir bitki oluşturulur. Bitkinin toprak üstü kısmına yani gövde ve dalları oluşturacak asıl kısma kalem veya göz denir. Yeni bitkinin kök kısmını oluşturacak olan, aşının yapıldığı kısma anaç denir. Anaç bitkinin kök kısmını oluşturur. Anaçlar; çöğür, yoz ve klon olarak adlandırılır. Yabani çeşitlerin tohumlarından elde edilen anaçlara çöğür, kültür çeşitlerinin tohumlarından elde edilen anaçlara ise yoz adı verilir. Çöğür ve yozlar tohumdan üretildikleri için, aynı ağaçtan üretilseler bile ana bitkiye benzemezler. Klon anaçları, çelik, daldırma, kök veya dip sürgünü ve doku kültürü gibi vegetatif yöntemlerle üretilen anaçlardır. Klon anaçların morfolojik, fizyolojik, kimyasal ve kalıtsal özellikleri ana bitkiye benzer. Bundan dolayı anaç olarak daha çok klon anaçlar tercih edilir (MEGEP, 2007).

Biyoteknoloji, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı canlı sistemler ve bu sistemlerden oluşan teknolojilerin tümüdür. Bitkisel doku kültürü ve monoklonal antikor üretimi, genetik mühendisliği, enzim/protein mühendisliği, mutajenezis ve seleksiyon modern biyoteknolojinin araçlarıdır (Boyacıoğlu, 1994).

Hepaksoy (2004), Gisela 5 ve Gisela 6 klon kiraz anaçlarının *in vitro*'da çoğaltılan sürgünlerini *in vitro* koşullarda köklendirip, dış koşullara alıştırmak için uygun ortamı belirlemiştir. 0, 4, 8 µM IBA (Indole 3-butyric acide) veya NAA (1-Naphthalene acetic acid) ile 0, 4.96 µM BA (6-benzylaminopurine) içeren 1/2 MS ortamında 8.33 - 33.33% oranında köklenme olduğu bildirilmiştir. Aynı ortamlara 2 g l⁻¹ aktif kömür eklenmesi durumunda köklenmenin 25 - 50 % olduğu belirtilmiştir. Sürgünler köklenme ortamından önce NAA çözeltisine batırıldıklarında, köklenme oranının arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, Gisela 6 anacında köklenme oranı Gisela 5 anacına göre daha yüksek olmuştur. Bu çalışmada, *in vitro*'da gelişen köklü bitkilerin dış ortama aktarılması sırasında torf, perlit, cüruf ve harç kullanılmıştır. Aklimatizasyon için torfun en iyi ortam olduğu belirtilmiştir.

Arıcı (2008), Myrobalan 29-C, MaxMa 14, MaxMa 60, GF 677 ve GN anaçlarının tepe ve yan sürgünlerini kullanarak *in vitro* çoğaltım olanaklarını araştırmıştır. Bu amaçla eksplantlar, farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda BAP (6-

Benzylaminopurine), NAA ve GA₃ (Gibberellik Asit) hormonlarını içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Ortamlar arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlense de Myrobalan 29C için en fazla sürgün oluşumunun 1 mg l⁻¹ BAP+0.2 mg l⁻¹ NAA, MaxMa 60 için 2 mg l⁻¹ BAP+0.02 mg l⁻¹ NAA, MaxMa 14 için 2 mg l⁻¹ BAP+0.2 mg l⁻¹ NAA+0.5 mg l⁻¹ GA₃, GF 677 için 1 mg l⁻¹ BAP+0.02 mg l⁻¹ NAA, GN için 1 mg l⁻¹ BAP+0.02 mg l⁻¹ NAA+ 0.5 mg l⁻¹ GA₃ içeren ortamlarda gözlemlendiği belirtilmiştir.

Gürel ve Gülşen (1998 a) tarafından, Türkiye’de Ege ve Akdeniz bölgesinde oldukça önemli meyve ağacı olan badem (*Amygdalus communis L.*) çeşidi Texas ve Nonpareil’ in sürgün uçları, farklı konsantrasyonlarda IBA (0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l) ve BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l) hormonlarını içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılarak kültüre alınmıştır. Bu çalışmada, hormon bulunmayan ortamın veya düşük düzeyde IBA hormonu içeren ortamın sürgün gelişimi için uygun olduğu bildirilmiştir. 0.1 mg/l IBA ve 1.0 mg/l BAP kombinasyonunun, sürgün çoğaltımında ve sürgün büyüme oranında önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Genel olarak BAP’ ın sürgün gelişmesinde esentiyel olduğu fakat BAP’ ın yüksek dozlarının (2.0 veya 3.0 mg/l BAP) vitrifikasyona (camlaştırma) ve kallus gelişmesine sebep olduğu rapor edilmiştir.

Gürel ve Gülşen (1998 b), Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis L.*) çeşitlerinin sürgün uçları kullanmıştır. Farklı sakkaroz, agar ve pH düzeylerini içeren MS ortamı ve birbirini takip eden üç farklı kültür aşamasında (ilk dikim, şaşırtma ve çoğaltma) ayrı ayrı test edilmiştir. Sürgün proliferasyonu, sürgün gelişmesi ve büyümesi incelenmiştir. İlk dikim aşamasında, sadece % 5 ve % 6 sakkaroz dozlarının bulunduğu ortamlarda proliferasyonun uyarıldığı, % 0.5 veya % 6 sakkaroz ile pH 5.5 içeren ortamlarda en iyi eksplant gelişmesinin sağlandığı belirtilmiştir. Şaşırtma aşamasında, yine % 5 veya % 6 sakkaroz ile pH 5.5 içeren ortamlarda sürgün gelişmesinin ve büyümesinin en iyi olduğu kaydedilmiştir. Düşük agar dozlarında sürgün verimi ve gelişmesinin iyi olduğu fakat bu dozlarda sürgünlerde camlaşma meydana geldiğinden, bu aşama için % 0.7 agarın en uygun doz olduğu belirtilmiştir. Çoğaltma aşamasında ise, en yüksek sürgün verimi %3 ve % 4 sakkaroz, % 0.7 agar ve pH 5.5 düzeylerinde elde edilmiştir. Yüksek sakkaroz

ve agar dozlarının, sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumunu artırdığı bildirilmiştir.

Işıkalan vd. (2008), BA ve KIN hormonlarının farklı konsantrasyonlarının bulunduğu MS ortamlarında bademin (*A. communis* L. cv. Nonpareil) olgun tohumlardan izole edilen zigotik embriyolarını kültüre almışlardır. Her bir eksplant başına 11.0 ± 1.32 ve 14.7 ± 2.12 oranında sürgün elde edildiği bildirilmiştir. Yeni sürgünler için en iyi sonuçların 1.0 mg l^{-1} BA ile tamamlanan MS ortamlarından elde edildiği belirtilmiştir. Köklenmenin 8.0 mg l^{-1} IAA ile tamamlanan $\frac{1}{2}$ MS ortamından sağlandığı rapor edilmiştir. Tanımlanan bu metotlar ile bademin (*A. communis* L. cv. Nonpareil) ticari olarak hızlı bir şekilde çoğaltılmasında kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Pevalek-Kozlina vd. (1994), yabancı kirazın (*Prunus avium*) 5 yıllık (genotip 5/11) ve 55 yıllık (genotip P5) ağaçlarından elde edilen sürgünlerini BA, KIN, IBA, IAA, 6- (2-isopentyl) adenine (2İP) içeren ortamlarda kültüre almışlardır. P5 genotipi için 5.0 mg l^{-1} KIN ve 1.0 mg l^{-1} IAA konsantrasyonlarında bitki büyüme düzenleyicilerinin oldukça etkili olduğu belirtilmiştir. Genotip 5/11 'in sürgün oluşumunda en iyi cevabı, 1.0 mg l^{-1} BA ve 5.0 mg l^{-1} IBA içeren ortamda verdiği bildirilmiştir. Her iki klonun kolayca çoğaltıldığı ve olgun genotipten sürgün çoğaltımında inhibasyon oluşmadığı rapor edilmiştir.

Dziedzic ve Maladobry (2006), Oksin (IBA, NAA) ve Sitokinin (BA) hormonlarının sürgün çoğaltımında etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, üç çeşit kiraz anacı (PHL-6, PHL-84, F12/1) iki tür ortam (katı ortam ve iki fazlı ortam) kullanılarak kültüre alınmıştır. İki fazlı ortam, agarla (25 ml) katılaştırılmış ortamın içerisine 5 ml sıvı ortam dökülerek elde edilmiştir. Her iki ortama da (katı ortam ve iki fazlı ortam) BA ve NAA veya BA ve IBA hormonları ilave edilmiştir. NAA içeren ortamlarla, IBA içeren ortamlar karşılaştırıldığında, en iyi sürgün çoğaltımının IBA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamından sağlandığı belirtilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi Oksin hormonlarını (IBA, NAA) içeren WPM (Woody plant medium) ortamında yürütülmüştür. Çalışılan anaçların sürgün uzunlukları, kök sayıları, her bir sürgün için total kök sayıları birbirine benzer olarak rapor edilmiştir.

Pruski vd. (2005), Kanada-Alberta-Etmonton şehrinde yetişen Moğol kirazı (*P. fruticosa*) ve Nanking kirazının (*P. tomentosa* L.) 10 yıllık anaçlarından elde edilen dormant tomurcukları kullanmışlardır. Dormant tomurcuklar 0.49 µM IBA, 4.44 veya 8.88 µM BA eklenen Murashige and Skoog Minimal Organik (MSMO) katı ortamında kültüre alınmıştır. En iyi sürgün teşvikinin 8.88-15.16 µM BA içeren ortamda saptandığı belirtilmiştir. 0.91 µM TDZ (1-phenyl-3- (1,2,3- Thiadiazol-5-yl) urea) içeren ortamlarda sürgün teşviki ve köklenmeye olumlu bir yanıt elde edildiği, en iyi köklenmenin (79 %) IBA/NAA (9.80/2.69 µM) konsantrasyonundan sağlandığı bildirilmiştir. Ticari köklenme tozunun da, Rootone F, IBA/NAA (0.057/0.067 %) içerdiği ve etkili olduğu (73 %) rapor edilmiştir.

Liu ve Pijut (2008) tarafından yapılan çalışmalarda, siyah kiraz *P. serotina*'nın #3 ve #4 genotipli olgun fidanları ve 3 yıllık F genotipli fidanları kullanılmıştır. Bu çalışmada, yapraklarda sürgün rejenerasyonunu sağlayabilmek için TDZ ve NAA kullanılmıştır. F genotipinde en iyi rejenerasyon (91.4 %), 9.08 µM TDZ ve 1.07 µM NAA içeren ortamlarda meydana gelmiştir. En yüksek sürgün sayısının (8.2), 9.08 µM TDZ ve 0.54 µM NAA içeren ortamlardan elde edildiği kaydedilmiştir. Genotip #3' te 4.8 sürgün sayısı ile en yüksek rejenerasyon (41.7 %), 9.08 µM TDZ ve 1.07 µM NAA içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Genotip #4' te 3.3 sürgün sayısı ile 38.8% rejenerasyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Genotip #4' te en yüksek sürgün sayısının (4.8), 4.54 µM TDZ ve 1.07 µM NAA içeren ortamlarda gerçekleştiği belirtilmiştir. 60 µM veya 80 µM gümüş difosfat kullanımıyla genotip #3 (75%) ve genotip #4' te (58%) rejenerasyon oranının artırıldığı rapor edilmiştir. Oluşan eksplantların köklenmesi için, 3 dakika veya 30 saniye 2.5, 5 veya 10 mM IBA içerisine daldırıldıktan sonra GA₇ (Gibberellic Acide) içeren ortamlara transfer edildiği belirtilmiştir. 2.5 mM IBA içerisine 3 dakika daldırma ile da genotip #3 (82%) ve genotip #4'te (71%) optimal köklenme meydana geldiği vurgulanmıştır.

Ning vd. (2007), *P. mume*' un, altı çeşidini kullanarak, *in vitro*' da çoğaltım olanaklarını araştırmışlardır. Japonya ve Çin' de peyzaj uygulamalarında *P. mume*' un popüler bir bitki olduğu belirtilmiştir. Eksplant kaynağı olarak nodal segmentler kullanılmıştır. En yüksek çoğaltım oranının (2.5' den 5.5'e), TDZ, BA, IBA, 2,4-D(2,4-Diklorofenoksi asetik asit) veya NAA eklenen modifiye MS ortamı ve temel WPM ortamından elde edildiği bildirilmiştir. 2.2 µM TDZ, 2.2 µM BA ve 2.5 µM

IBA ile tamamlanan WPM ortamında etkili bir çoğalma meydana gelmiştir. Sürgünlerin 2.5 µM veya 5.0 µM IBA içeren ½ MS veya temel WPM ortamında köklendirildiği belirtilmiştir. En çok köklenip, uzunluğu 10 mm' den daha fazla olan ve en az 3 kökten oluşan bitkiciklerin toprağa transfer edildiği kaydedilmiştir.

Perez-Tornero vd. (1999), Canino, Currot, Bulida ve Bergeron badem çeşitlerinin mikroçoğaltımı üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Apikal gözlerin meristemleri, Quorin ve Lepoivre makro-mikro besin elementleri, Myo-inositol, Thiamine, Nikotonik asit, Biotin, Aminobenzoik asit, Ribofilavin, Ca-pantothenate, % 2 sorbitol ve % 0.6 agar içeren ortamda kültüre alınmıştır. Meristemlerden sürgün gelişimi amacıyla BA, GA, IBA kullanılmıştır. Meristemden sürgün gelişiminde BA' nın bitkinin genotipine bağlı olarak olumlu etki gösterdiği vurgulanmıştır. GA' nın ise sürgün boylarının uzamasında artışa neden olduğu ve GA' nın meristem canlılığında önemli bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Fakat eksplantların boyunda uzamayı sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada badem meristemlerinin kültüre alınmasında optimum BA konsantrasyonunun 0.5-2 mg l⁻¹ olması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca meristemler kültüre alındığından 2 ile 4 hafta sonrasında en uygun GA konsantrasyonunun 2-4 mg l⁻¹ olması gerektiği vurgulanmıştır. Denemede kullanılan çeşitler arasında farklılık olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, badem üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarının oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Çünkü bademi çelikle çoğaltmak zordur ve bu nedenle anaç üzerine aşılır. Badem üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarının, diğer *Prunus* türleri ile karşılaştırıldığında daha az olduğu belirtilmiştir. Badem üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarını sınırlandıran diğer bir faktörün ise kontaminasyon olduğu belirtilmiştir. Arazi koşullarında yetiştirilen meyve ağaçlarında mikroorganizma gelişmesinin meydana geldiği bildirmiştir. Bu bitkilerde gelişen mikroorganizmaların *in vivo* koşullarda bitkiye zarar vermeyebileceği belirtilmiştir. Fakat bu tip bitkilerden alınan eksplantların besin elementlerince zengin ortamlarda kültüre alındığında bakteri ve fungus sporlarının hızlı bir gelişim göstereceği vurgulanmıştır.

Kalinina ve Brown (2007), Kuzey Amerika'da ticari öneme sahip olan 9 tane *Prunus* türü (*P. americana*, *P. cistena*, *P. glandulosa*, *P. serrulata* 'Kwazan', *P. laurocerasus*, *P. sargentii*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. virginiana* 'Schubert') ve genellikle *Prunus* virüsü testlemesinde kullanılan GF305 çeşidi üzerinde mikro çoğaltım yapmışlardır. *Prunus* çeşitlerinin eksplant kaynağı Nigara yöresinin

(Ontario, Kanada) fidanlığında, GF305' in eksplant kaynağı Bordeaux' daki (Fransa) INRA araştırma merkezinden elde edilmiştir. Çalışmalarda 1 yıllık ağaçların eksplantları kullanılmıştır. GF305 için şeker kaynağı olarak, sakkaroz yerine fruktozun kullanılması ve ½ MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamına 1 mg l⁻¹ FA (Ferulic acid; trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic) eklenmesi, sürgün gelişimi oranını artırdığı ve *in vitro* kültürlerin uzun süreli muhafaza edilmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir.

Shekafandeh (2010), iki badem çeşidinin (Shahrood 8 ve Shahrood 10) *in vitro* kültürü için farklı Oksin, pH ve 1.5-2 mg l⁻¹ BA oranlarını test etmiştir. Bu çalışmada NAA ve IBA uygulandığında sürgünlerin tabanlarında kallus oluştuğu belirtilmiştir. NAA uygulanması kırılğan kallusların oluşmasını, IBA uygulanması ise kompakt (yoğun) kallusların oluşmasını sağlamıştır. Kullanılan iki Oksin (NAA, IBA) karşılaştırıldığında, sadece IBA uygulanan sürgünlerde köklenmenin meydana geldiği belirtilmiştir. pH seviyesinin köklenmede önemli bir etkiye sahip olduğu ve Shahrood 8'in sürgünlerinin pH 5.7' de 70 % oranında, Shahrood 10 sürgünlerinin pH 4.8' de 60% oranında köklendiği rapor edilmiştir.

Channuntapipat vd. (2003), badem/şeftali hibrit anacının (*P. dulcis* cv. Titan × *P. persica* cv. Nema-guard) ve badem çeşitlerinin (Nonpareil 15-1 ve Ne Plus Ultra) *in vitro* sürgün kültürlerini kullanmışlardır. Sürgün çoğaltımına uygun ortamlarda, ortalama 0.7 cm uzunluğundaki 3-5 yapraklı sürgün uçlarıyla sürgün çoğaltımı yapılmıştır. Nonpareil 15-1, 0.049 mM IBA, 3 mM BAP, 0.058 M sakkaroz ve 0.7 % agar içeren, pH 5.7' ye ayarlanan AP (Almehdi ve Parfitt) ortamlarından etkilenmiştir. Ne Plus Ultra için, 0.049 mM IBA, 5 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve 0.7 % agar içeren, pH 5.7' ye ayarlanan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı sürgün gelişimi için uygun olarak belirtilmiştir. Titan × Nema-guard hibritleri için, 10 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve 0.7% agar eklenen MS ortamı sürgün çoğaltımını en iyi sağlayan ortam olmuştur. Anaçların 2 cm uzunluğundaki sürgünleri, 2.4 mM IBA, 0.088 M sakkaroz ve 0.7 % agar eklenip pH 5.7' ye ayarlanan MS ortamlarında 2 hafta ışıklı, 1 hafta karanlık ortamda 88.0 % oranında köklendirilmiştir. Nonpareil (15-1) 50 %, Ne Plus Ultra 65 % oranında hayatta kaldığı, köklenen anaçların ve köklenen mikrograft bitkilerin başarılı bir şekilde aklimatizasyonlarının yapıldığı rapor edilmiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2004), Yunanistan'ın Pomoloji Enstitüsünde selekte edilen, şeftali × badem hibriti PR 204/84 (*P. persica* × *P. amygdalus*) şeftali anacını kullanmışlardır. PR 204/84 şeftali anacı GF-677' ye bir alternatiftir. Karbon kaynağı olarak sakkaroz veya glukozun farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Her bir MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamına sakkaroz veya glukozun yanında 5 µM IBA eklenmiştir. Kültür ortamlarına farklı şekerlerin ilavesinin, eksplantların sürgün çoğaltımı potansiyelini etkileyebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada PR 204/84'ün *in vitro* kültürlerinde en fazla köklenme (ortalama kök sayısı) 88 mM sakkaroz veya glukoz içeren ortamlarda elde edilmiştir. Ayrıca ortamların kapatılmasında kullanılan parafilm, kauçuk, pamuk ve alüminyum folyo gibi materyallerin köklenmeye etkisi araştırılmıştır. Parafilm, kauçuk, alüminyum folyo materyallerinin köklenme oranı için önemli bir fark yaratmadığı belirtilmiştir. Pamuk kullanımının ise her bir sürgünde en düşük kök sayısına ve kök uzunluğuna sebep olduğu rapor edilmiştir.

Espinosa vd. (2006), *P. serotina* Ehrh.' nin nodal segmentlerini, 0.29 µM GA, 0.49 µM IBA, 4.44 µM BA ile tamamlanan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında kültüre almışlardır. *P. serotina*' nin *in vitro* yaprak eksplantları, 0.0, 0.54, 1.07, 5.37 µM NAA ve 0.0, 4.44, 8.88, 13.32 µM BA kombinasyonları ile tamamlanan WPM ve 0.0, 0.54, 1.07, 5.37 µM NAA, 0.0, 2.27, 4.54, 6.81 µM TDZ ile tamamlanan WPM ortamına yerleştirilmiştir. TDZ' nin, sürgün rejenerasyonu sayısında önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ortalama sürgün sayısı en fazla, her bir eksplantta 5.05±1.14, 2.27 µM TDZ ve 0.54 µM NAA içeren ve ışık uygulamasından sonra 3 hafta boyunca karanlık odada tutulan ortamdan elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu oranı (38.8) ve ortalama sürgün sayısı (4.13±0.97), 6.81 µM TDZ ve 1.07 µM NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca en çok köklenme (27 %), önceden 16 saat ışıkta bekletilip, daha sonra 7 gün boyunca karanlıkta bekletilen yan sürgünlerden elde edilirken, her bir sürgünden en fazla kök sayısı (2.3±0.2), 2.5 µM IBA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Stok kültürlerden elde edilen nodal eksplantlarda ise, en yüksek köklenme (70 %) ve her bir sürgünün kök sayısı (2.7±0.9), 16 saatlik fotoperiyota transfer edilmeden önce 4 gün boyunca karanlıkta muhafaza edilen ve 2.5 µM IBA içeren ortamlarda kültüre alınan sürgünlerden sağlanmıştır. Toplamda, bitkiciklerin 86%' sının aklimatize olduğu ve soğuk depoda kışlama döneminden sonra 100%' ünün hayatta kaldığı rapor edilmiştir.

Antonopoulou vd. (2007), şeftali hibrit anacı GF-677 (*Prunus amygdalus*×*Prunus persica*) kullanılarak anaçların *in vitro* köklenmesinde demirin şelat formu olan ethylendiamine di-o-hydroxyphenylacetic (Fe-EDDHA) (% 6 Fe) tuzunun etkilerini araştırmışlardır. Ethylendiamine tetraacetic acide (Fe-EDTA) tuzlarının yerine koyulan Fe-EDDHA' nın 3 konsantrasyonu kullanılmıştır: 93.5, 187.0, 280.5 mg l⁻¹ (sırasıyla; 5.6, 11.2, 16.8 mg l⁻¹ Fe). Ayrıca her bir Fe-EDDHA uygulaması için de 4 farklı konsantrasyonda (0, 0.1, 1.0, 10 mg l⁻¹) eklenen askorbik asidin etkisi çalışılmıştır. Eksplantların en iyi köklenmeyi 280 mg l⁻¹ Fe-EDDHA' da verdiği vurgulanmıştır. Askorbik asidin köklenmeye net olmayan bir etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Leifert ve Cassells (2001), mikro organizmaların (funguslar, bakteriler virüsler ve viroidler) ve mikroartropodların (tripsler ve akarlar) bitki doku kültüründe kontaminasyona neden olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu tip kontaminasyonların, doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantlarla, laboratuvar çalışmalarıyla veya mikroartropod vektörleri aracılığıyla meydana gelebileceği belirtilmiştir.

Kontaminasyonların kültüre alınmayı takiben gelişebileceği veya uzun bir süre latent kalabileceği vurgulanmıştır. Birçok bitki türünde dezenfeksiyon protokolleri geliştirilmiştir. Antibiyotik ve fungusit kullanımı bakteri ve fungus kontaminasyonlarının engellenmesinde kullanılmasına rağmen bu tip bulaşıklıkların önemli problemleri oluşturabilmekte olduğu rapor edilmiştir. Özellikle gram negatif bakterilerin kontrolünün doku kültürü çalışmalarında başarısız olduğu kaydedilmiştir.

Mikrobiyal kontaminasyon, bitki hücre kültürleri ve bitki doku kültürlerinin en önemli problemlerinden biridir. Kontaminantlar, laboratuvar çalışmaları esnasında veya mikroartropod vektörleri aracılığıyla, eksplantlarla ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca kontaminantlar, bitki doku kültürlerine bulaştıktan hemen sonra hızlı bir şekilde yayılabilirler veya uzun bir süre latent (gizli) kalabilirler. Fakat 'Filamentous Fungi' ler ve mayalar çok nadir latent kalabilirler. Çünkü bitki doku kültürü ortamları fungusların büyüebilmeleri için gerekli esentiyel elementleri sağlarlar. Çevresel etmenli bakteriler hızlı bir şekilde bitki doku kültürlerinde gelişirken, diğerleri (*Pseudomonads* spp., *Xanthomonads* spp., *Corynebacteria* spp. vd.) spesifik olmayan ortamlarda hızlı bir şekilde üreyemedikleri için latent kalabilirler. Bununla

birlikte bitki büyümesi ve kök oluşumu oranını azaltırlar. Genellikle *Pseudomonas* (partiküler *P. fluorescens*), *Erwinia* spp. ve *Agrobacterium* spp. gibi gram-negatif bakteriler dezenfeksiyon prosedürleri yetersiz olduğunda açığa çıkarlar. Gram-pozitif bakteriler, ortamın sterilizasyonunun yetersiz olduğunu (*Bacillus* spp.) veya aseptik teknikler için teknikerlerin deneyimlerinin yetersiz olduğunu (*Staphylococcus* spp.) gösterir. ‘Filamentous Fungi’ ve maya kontaminasyonları laboratuvar çalışmaları sırasında veya eksplantlarla ortaya çıkabilir. Spesifik funguslar (*Fusarium poe*) ve hızlı yayılan fungal kontaminasyonlar, klima odalarında vektörlerin veya akarların varlığıyla kendilerini gösterirler. Bu mikro artropodlar, doku kültürlerinde, bakteriyel kontaminantlar ve fungal sporlarla kendiliğinden ortaya çıkabildikleri gibi, kültür kaplarına bulaşmış olabilirler. Bunun yanında, son zamanlarda, bazı insan patojenlerinde (*Candida albicans* ve *Trichophyton* spp.) bitki doku kültürü ortamlarında bulunabilir. İnsan patojeni olan bakterilerin, kontamine olan eksplantların kültüre alınmasıyla varlıklarını devam ettirdikleri ve *in vitro* bitkilere patojen olabildiği görülmüştür (Leifert ve Cassels, 2001) .

Doku kültürlerindeki kontaminasyon, eksplantların dokularında veya yüzeylerinde bulunan kontaminantlardan ve laboratuvar çalışmalarındaki hatalardan kaynaklanmaktadır. Bitki yüzeyi mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarıdır. Doku hasarı gibi nedenlerle mikroorganizmalar bitkilerin dokularına girer ve yerleşirler. Böylece bitki dokularında virüsler, viroidler, prokaryotlar ve mantarlardan oluşan bir flora gelişir. Doku kültürlerinde kullanılan eksplantlardaki bu mikroorganizmalar kültür içerisine taşınırlar. Meristem kültürlerinde kullanılan eksplantların büyüklüğüne bağlı olarak birçok mikroorganizma ortadan kaldırılabilir. Yaprak, yaprak petiolü ve gövdeden alınan eksplantlarda mikroorganizmalar dokulardan uzaklaştırılmazlar. Bitkilerin sterilizasyonu ile bu mikroorganizmalar azaltılabilir (Cassels, 1993).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada, 1-3 yıllık, erik + kayısı klon anacı Myrobalan 29C (*Prunus cerasifera*) (Şekil 3.1.) ve şeftali x badem (*Prunus persica x Prunus dulce*) hibrit anacı Garnem (GN 15) kullanılmıştır. Myrobalan 29-C ve Garnem (GN 15) anaçlarının (Şekil 3.1.) sürgün gözleri, yaprak ve yaprak petiolleri farklı hormon konsantrasyonu ve kombinasyonu içeren ortamlarda, steril koşullarda kültüre alınmıştır. Anaçlar 'Frutaş Tarım' dan (Adana) elde edilmiştir. Anaçlar 2009 yılında, Gaziantep Üniversitesi Botanik Bahçesine dikilmiş ve çalışmada kullanılan eksplantlar bu bitkilerden alınmıştır.



Şekil 3.1. Garnem (a,b) ve Myrobalan 29C (c,d) anaçlarının, 2010 Nisan ayındaki, Gaziantep Üniversitesi Botanik Bahçesindeki görünümü

3.1.2. Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalar boyunca tüm denemelerde MS (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro besin elementleri ile Gamborg B5 vitaminlerini içeren modifiye MS [Phyto Technology Laboratories (ABD)] ortamı kullanılmıştır. Ayrıca 3 % sakkaroz, bitki büyüme düzenleyicileri (Oksin ve Sitokinin), 8 g l⁻¹ agar ve tampon çözeltiler (NaOH, HCl) kullanılmıştır.

3.1.3. Kültür Ortamlarına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri

3.1.3.1. Sitokininler

Somatik dokulardan *in vitro*' da sürgün teşviki, kardeşlenme ve köklenmeyi sağlamak amacı ile 3 % sakkaroz içeren modifiye MS ortamına 6-Benzylaminopurine (BAP, C₁₂H₁₁N₅) ve 6-Furfurylaminopurine (Kinetin, C₁₀H₉N₅O) hormonları (Merck) ilave edilmiştir.

3.1.3.2. Oksinler

In vitro sürgün teşviki, kardeşlenme ve köklenmeyi, sağlamak amacı ile 3 % sakkaroz içeren modifiye MS ortamına 1-Naphthalene acetic acid (NAA, C₁₀H₇CH₂CO₂H), Indole 3- acetic acide (IAA, C₁₀H₉NO₂) ve Indole 3-butyric acid (IBA, C₁₀H₁₃NO₂) hormonları (Merck) ilave edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması

Makro, mikro besin elementleri ve Gamborg B5 vitaminlerini içeren modifiye MS ortamından [Phyto Technology Laboratories (ABD)] firma önerisi doğrultusunda 4,44 g l⁻¹ tartılıp 600-700 ml dH₂O' da çözülmüştür. Karışıma karbon kaynağı olarak 3 % (30 g l⁻¹) oranında sakkaroz ilave edilmiş ve çözeltinin tamamı 1000 ml olacak şekilde dH₂O ilave edilmiştir.

Stok çözeltiyle ortam hazırlandığında ise, EK 2' de verilen oranlarda A, B, D stok solüsyon grubundaki kimyasallar tartılmış ve dH₂O ile çözümlenerek çözelti 100 ml' ye tamamlanmıştır. Stok C' nin hazırlanışındaysa FeSO₄.7H₂O EK 2' de belirtilen oranlarda tartılmış ve 90 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu çözelti, ısıtıcılı karıştırıcıda karıştırılarak rengi açık sarı-berrak oluncaya kadar ısıtılmıştır. Daha

sonra Na₂EDTA-2H₂O (Titrplex) ilave edilmiş ve çözeltinin tamamı dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanıp, pH 5.5' e ayarlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4 °C' de muhafaza edilmiştir. 1 litre kültür ortamının hazırlanması için stok solüsyonların her birinden 10 ml kullanılmış ve EK 3' te verilen kimyasallardan da (agar hariç) belirtilen oranlarda alınarak çözelti saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Bitki büyüme düzenleyicileri otoklavdan önce belirli kombinasyon ve konsantrasyonlarda ilave edilmiş, çözeltinin pH' sı 1 M NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5,7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra ortamlara katılması için 8 g l⁻¹ agar ilave edilmiş ve otoklavda 1 atm basınçta 121 °C' de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyonu takiben ortamlar steril kabine alınmış, önceden hazırlanan steril kültür kaplarına (8 cm çaplı cam petri) 25-30 ml oranında dökülmüş ve katıldıktan sonra kullanılmıştır. Tüplere ekim yapılacaksa ortamın pH' ı 5.7' ye ayarlandıktan sonra ortamlar 2.5x20 cm boyutundaki cam tüplere (20 ml) aktarılmış ve otoklavda sterilizasyonları yapılmıştır.

Besi yerlerine aktarılan eksplantlar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık, 24±2 °C

sıcaklıktaki iklim odasında kültüre alınmış, 4 hafta sonra iklim odasında bekletilen kültürlerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.2. Bitkilerin Sterilizasyonu

In vitro koşullarda klonal çoğaltımı yapılacak anaçların, yüzeysel dezenfeksiyonunu sağlamak amacıyla eksplantlar önce 20-30 dakika akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra Tween 20 içeren % 1.5, 5, 10' luk sodyum hipoklorit içerisinde 1 veya 2 kere 5-10 dakika bekletilmiş ve steril saf su (dH₂O) ile 3 kez yıkanmıştır. Eksplantlar steril filtre kâğıt üzerinde kurutulduktan sonra, içerisinde farklı hormon konsantrasyonunda hazırlanan, modifiye MS ortamı içeren cam petri/tüpler içerisinde kültüre alınmıştır. Bütün bu işlemler steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan steril kabin içinin sterilizasyonunda, kabin kullanımdan 1 saat önce kabin içinde bulunan UV lambaları çalıştırılmış ve sürenin bitiminden hemen sonra lamba karartılıp, çalışmaya başlamadan önce % 70' lik alkolle kabinin içi silinmiştir. Sürgün uçlarının çıkarılmasında, kesiminde ve tüplere yerleştirilmesinde kullanılan alet, ekipmanlar (pens, bisturi vb), filtre kâğıtları ve sterilizasyonda kullanılan dH₂O otoklavda 1 atmosfer basınçta 121°C de 15 dakika süreyle steril edilmişlerdir.

3.3.3. *In vivo*' da Gelişen Bitkilerde Mikroçoğaltım

Myrobalan 29C ve Garnem anaçlarının yaprak, yaprak petiolü ve sürgün ucu eksplantları Oksin (NAA, IAA ve IBA) ve Sitokinin (BAP ve Kinetin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹) kullanılarak kültüre alınmıştır. Kontrol olarak kullanılan kültürlere herhangi bir hormon ilavesi yapılmamıştır.

3.3.3.1. Sürgün Teşviki

Sürgün oluşumu çalışmalarında 5 farklı hormon kombinasyon [6-Benzylaminopurine (BAP)/Indole 3-butyric acid (IBA) veya 6-Furfurylaminopurine (KIN)/1-Naphthalene acetic acid (NAA)] ve konsantrasyonu kullanılmıştır. Çalışmalarda Sitokinin hormonları (BAP, KIN) 0.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ konsantrasyonunda, Oksin hormonları (IBA, NAA) 0.0, 0.5 mg l⁻¹ konsantrasyonunda kullanılmıştır. Denemede her kombinasyon 10 tekrarlı olarak hazırlanmış ve tüm denemeler 5 kez kurulmuştur. Hormon içeren kültür ortamları, otoklavı takiben, standart petrilere 25-30 ml olacak şekilde dökülmüş, katılaşma sağlanıp, aynı gün içerisinde veya ertesi gün olacak şekilde bitkiler transfer edilmiştir.

Eksplant kaynağı olarak Myrobalan 29C ve Garnem anaçlarının sürgün gözü, yaprakları ve yaprak petiolleri kullanılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra, yaprağın petiolü çıkartılıp yapraktan bağımsız kültürü yapılmış, yaprak orta damarından kesildikten sonra yaprağın damar içeren kısmı 3 parçaya ayrılmış ve kültürü yapılmıştır. Sürgün gözleri ise kontamisasyonu en aza indirebilmek için, meristeme zarar verilmeyecek şekilde, dip kısmından kesilerek kültüre alınmıştır.

Bitki transferini takibinde, kültürler 24 ± 2 °C’ de 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilmiştir. Kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra sürgün uzunlukları ve kardeşlenme sayıları belirlenmiştir.

3.3.3.2. Kardeşlendirme Çalışmaları

Kardeşlendirme çalışmalarında Garnem ve Myrobalan 29C anaçlarının *in vivo*’ da yetişen sürgün gözleri kullanılmıştır. Kardeşlenme çalışmaları için, MS modifiye ortamına Oksin [0.0, 0.5 mg l⁻¹ NAA (1-Naphthalene acetic acid)/ IBA (Indole 3-butyrac acid)/ IAA (Indole 3- acetic acide)] ve Sitokinin [0.0, 1.0, 2.0 mg l⁻¹ BAP (6-Benzylaminopurine) ve KIN (Furfurylaminopurine)] hormonları ilave edilmiştir.

Kardeşlendirme çalışmalarında 7 farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonu kullanılmıştır. Her kombinasyon 10 tekrarlı olarak hazırlanmış ve tüm denemeler 5 kez kurulmuştur. Bitki büyüme düzenleyicilerini içeren kültür ortamları agarı eritildikten sonra standart tüplere 15-20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Otoklavı takiben ortamlar katılaştıktan sonra aynı gün içerisinde veya ertesi gün olacak şekilde bitkiler transfer edilmiştir. Bitki transferini takibinde, kültürler 24 ± 2 °C’ de 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilmiştir. Kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra Myrobalan anaçının sürgün gözlerindeki sürgün uzunluğu ve kardeşlenme sayısı, Garnem anaçının sürgün gözünde ise yaprak sayısı ve kallus oluşumu belirlenmiştir.

3.3.3.3. Köklendirme Çalışmaları

Kardeşlenmeye teşvik edilen Myrobalan 29C anaçının sürgün gözleri ve Garnem anaçının *in vivo* ’da yetişen 1-3 yıllık fidanlarından elde edilen sürgün gözleri köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Bu amaçla MS modifiye ortamına Oksin [0.0, 0.1, 0.2, 0.4 mg l⁻¹ NAA (1-Naphthalene acetic acid), IBA (Indole 3-butyrac acid), IAA (Indole 3- acetic acide)] ve Sitokinin [0.0, 1.0 mg l⁻¹ BAP (6-Benzylaminopurine)] hormonları ilave edilmiştir.

Köklendirme çalışmalarında 9 farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonu kullanılmıştır. Her kombinasyon 10 tekrarlı olarak hazırlanmış ve tüm denemeler 3 kez kurulmuştur. Hormon içeren kültür ortamları, standard tüplere 15-20 ml olacak şekilde dökülmüş, otoklavda sterilitesi sağlanmış, katılaşmayı takiben aynı gün içerisinde veya ertesi gün olacak şekilde bitkiler transfer edilmiştir. Bitki transferini

takibende, kùltùrler 24 ± 2 °C' de 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilmiştir. Deęerlendirilmeler kùltùre alındıktan 4 hafta sonra yapılmıştır.

3.3.4. İstatistiksel Analiz

Araştırma bulgularının istatistiksel analizi SPSS (SPSS 11.0 for Windows) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Hangi grubun ya da grupların farklı olduğunu belirlemek amacı ile One-Way ANOVA LSD testi uygulanmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. *In vivo*' da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarından Sürgün Oluşturma Çalışmaları

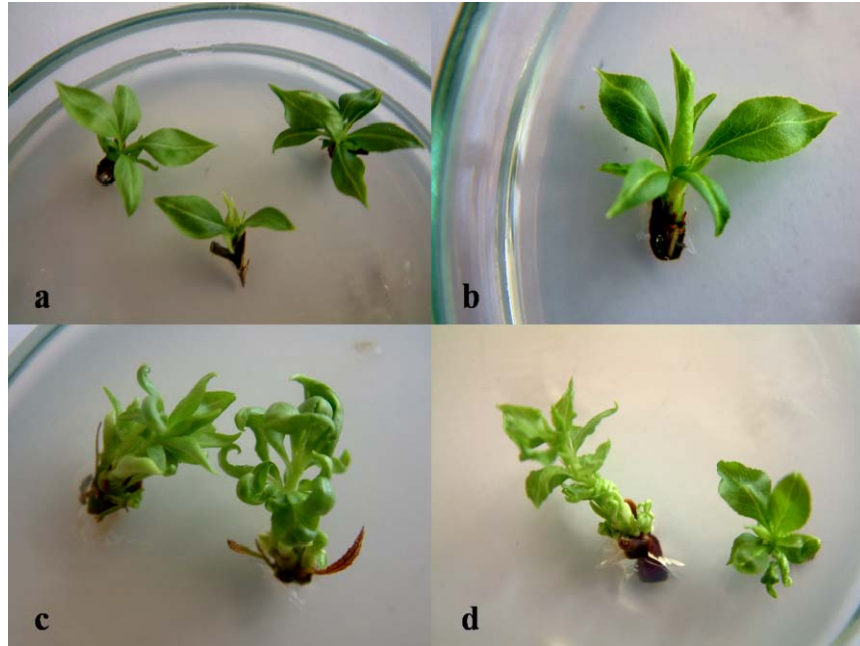
Sürgün oluşturma çalışmalarında, Oksin (NAA) ve Sitokinin (KIN) hormonlarını içeren modifiye MS ortamında, kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde Garnem (GN 15) ve Myrobalan 29C anaçlarının yaprak ve yaprak petiollerinde sürgün oluşumu gözlenememekle birlikte bazı kombinasyonlarda kallus elde edilmiştir. Bununla birlikte, KIN ve NAA hormonlarını içeren modifiye MS ortamında, Myrobalan 29C anaçlarının sürgün gözlerinde sürgün oluşumu meydana gelirken, Garnem anacının sürgün gözlerinde sürgün oluşumu gerçekleşmemiş ve kallus saptanmıştır. Ayrıca denenen kombinasyonlarda, Garnem ve Myrobalan 29C anaçlarının eksplantlarında köklenme meydana gelmemiştir. Myrobalan 29C anacının sürgün uzunlukları Tablo 4.1' de ve oluşan sürgünlerin görünüşleri Şekil 4.1.' de verilmiştir.

Tablo 4.1. KIN ve NAA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS modifiye ortamı üzerinde kültüre alınan Myrobalan 29C anacı sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu oranları

Uygulama	Sürgün sayısı	Sürgün Uzunluğu (mm)
KONTROL	1,00	13,25
2 mg l ⁻¹ KIN	1,67**	17,40
4 mg l ⁻¹ KIN	3,00***	18,67
2 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ NAA	1,08	14,67
4 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ NAA	2,60***	15,40

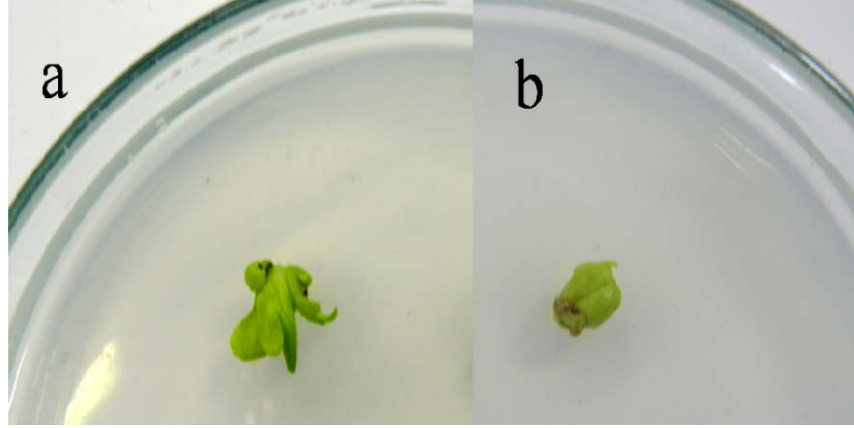
*: p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 değerleri LSD testi'nde istatistiksel olarak önemi belirtir.

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi Myrobalan 29C anacının sürgün gözü eksplantlarının kültüre alındığı sürgün teşviki denemesinde, en yüksek sürgün sayısı (3.00) ve en yüksek sürgün uzunluğu (18,67 mm) 4 mg l⁻¹ KIN içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. Ayrıca, en yüksek sürgün sayısı (3.00), istatistiksel olarak p<0.001 seviyesinde önemli bulunmuştur. Sürgün teşviki denemesinde kullanılan tüm hormon kombinasyon ve konsantrasyonundaki sürgünlerde düzenli olmayan kardeşlenme gözlemlenmiştir. Sürgün sayısında, kontrole göre hormon içeren ortamlarda önemli derecede fark olduğu saptanmıştır. KIN hormonunu içeren modifiye MS ortamlarında NAA hormonunu içeren ortamlara nazaran sürgün boylarının daha uzun olduğu ve sürgün sayılarının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, KIN ve NAA hormonlarının birlikte kullanıldığı kombinasyonlarda, KIN hormon miktarının artırılmasıyla sürgün uzunluğunda ve sürgün sayısında artış meydana gelmiştir (Tablo 4.1.).



Şekil 4.1. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinin KIN ve NAA hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünler **a, b**: 2 mg l⁻¹ KIN içeren modifiye MS ortamında kültüre alınan sürgün gözü eksplantlarından gelişen Myrobalan 29C bitkileri. **c, d**: 4 mg l⁻¹ KIN içeren modifiye MS ortamında kültüre alınan sürgün gözü eksplantlarından gelişen Myrobalan 29C bitkileri.

Garnem anacının yaprak, yaprak petiolü ve sürgün gözleri 0.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ BAP ve 0.0, 0.5 mg l⁻¹ IBA kombinasyonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde sürgün oluşumunun meydana gelmediği saptanmıştır. Bütün kombinasyonlarda sürgün gözleri sadece hafifçe açılmış (Şekil 4.2.) ve bütün eksplant kaynaklarında çok az miktarda kallus oluşmuştur. Garnem anacı eksplantlarında köklenme meydana gelmemiştir.



Şekil 4.2. 2mg l⁻¹ BAP bulunan ortamda kültüre edilen Garnem (GN 15) sürgün gözleri (a,b)

4.2. *In vivo*' da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarından Kardeşlendirme Çalışmaları

Kardeşlenme çalışmalarında, modifiye MS (%3 sakkaroz) ortamına Sitokinin (BAP ve KIN) ve Oksin (NAA/IBA/IAA) hormonlarının değişen düzeylerindeki konsantrasyonları (0.0, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) ilave edilerek Myrobalan 29C ve Garnem anaçlarının sürgün gözleri kültüre alınmıştır. Kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra gerçekleştirilen değerlendirmede Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinde kardeşlenmelerin olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.2). Kök oluşumu meydana gelmemiştir.

Tablo 4.2. KIN, BAP, NAA, IAA, IBA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre alınan Myrobalan 29C anacının sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu oranları

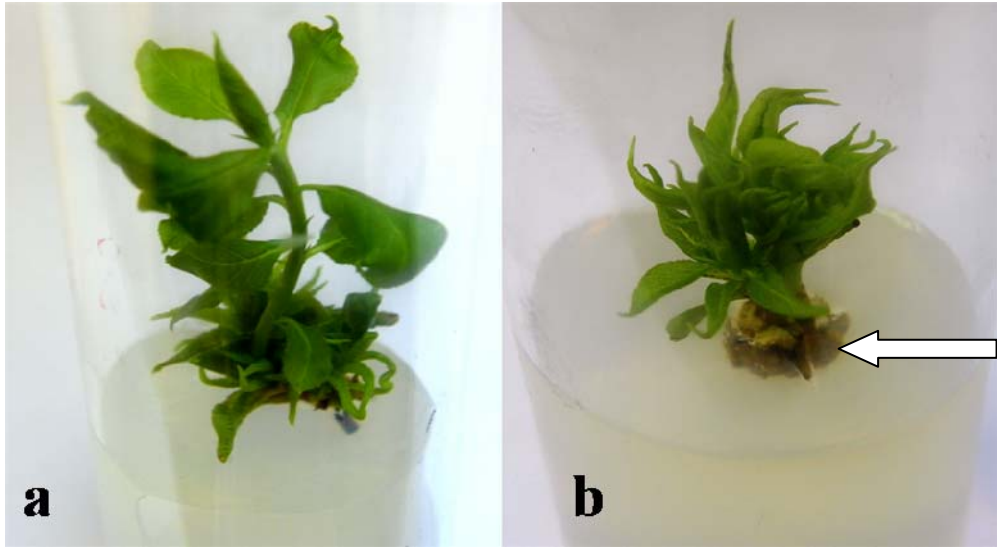
Uygulama	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (mm)
KONTROL	1.667	6.333
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ NAA	3.000*	8.750
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ NAA	4.778***	10.000*
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ IBA	3.333**	11.167**
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ IBA	3.875***	10.125*
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ IAA	4.000***	8.857
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+0.5 mg l ⁻¹ IAA	2.750	7.625

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 değerleri LSD testi'nde istatistiksel olarak önemi belirtir.

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi Myrobalan 29C anacının sürgün gözü eksplantlarının kültüre alındığı kardeşlenme denemesinde en yüksek sürgün sayısı (4.778), 2.0 mg l⁻¹ BAP + 2.0 mg l⁻¹ KIN + 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiş ve istatistiksel olarak p<0.001 seviyesinde önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu (11.167 mm) ise, 1.0 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ KIN + 0.5 mg l⁻¹ IBA içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiş ve istatistiksel olarak p<0.01 seviyesinde önemli bulunmuştur. Kontrol ortamına nazaran hormon eklenen ortamlarda sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda önemli derecede artış olduğu saptanmıştır. BAP, KIN, NAA ve BAP, KIN, IBA bulunan ortamlarda BAP ve KIN seviyesinin artırılmasıyla sürgün sayısında artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. BAP, KIN ve IAA bulunan ortamda ise bunun aksine BAP ve KIN seviyesinin artırılmasıyla sürgün sayısında azalma meydana geldiği görülmüştür.

Kardeşlenme denemesinde kullanılan her bir hormon kombinasyon ve konsantrasyonu, her sürgün gözünde ortalama 3 kardeş (sürgün) olmak üzere, düzenli kardeşlenme ve sürgün uzunluğu oluşturmuştur (Şekil 4.3.). Ayrıca sürgünlerin tabanında kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3b.). Oluşan

kallusların sert yapıda kahverengi renkte veya sert yapıda sarı renkte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinin Sitokinin ve Oksin hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünler **a:**1.0 mg l⁻¹ BAP+1.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IAA içeren modifiye MS ortamı, **b:** 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ NAA içeren modifiye MS ortamı ve bitki tabanında sert yapıdaki kallus oluşumu

Garnem' in sürgün gözlerinde ise kardeşlenme çalışmalarında az miktarda kallus oluşumu (Şekil 4.4.) ve sadece birkaç yaprak oluşumu gözlemlenmiştir (Tablo 4.3.). Garnem anacında oluşan kalluslar sarı-açık yeşil renkli ve dağılabilen yapıda ya da kahverengiye dönüşmüş sert yapıda olmuştur. Denenen tüm hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarında köklenme meydana gelmemiştir.

Tablo 4.3. KIN, BAP, NAA, IAA, IBA hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre alınan Garnem anacının sürgün gözleri eksplantlarında meydana gelen yaprak sayısı, kardeşlenme ve kallus gelişimi, **O.Y.S:** Ortalama Yaprak Sayısı **K:** Kardeşlenme, **K. G.:** Kallus Gelişimi

HORMON	O.Y.S	K	K. G.
KONTROL	2.87	-	-
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ NAA	2.77	+	+
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ NAA	1.75	+	+
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ IBA	2.56	+	-
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ IBA	1.8	+	-
1.0 mg l ⁻¹ BAP+1.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ IAA	0.6	-	-
2.0 mg l ⁻¹ BAP+2.0 mg l ⁻¹ KIN+ 0.5 mg l ⁻¹ IAA	2.02	+	-

Tablo 4.3.' de görüldüğü gibi Garnem anacının sürgün gözü eksplantlarının kültüre alındığı kardeşlenme denemesinde en yüksek yaprak sayısı ortalaması (2.87) hormonun içermeyen (kontrol) modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. Kontrol ortamına nazaran hormon eklenen ortamlarda yaprak sayılarının azaldığı fakat bazı hormon konsantrasyonlarında kardeşlenme ve kallus oluşumunun meydana geldiği saptanmıştır. BAP, KIN, NAA veya BAP, KIN, IBA bulunan ortamlarda BAP ve KIN konsantrasyonlarının artırılmasıyla yaprak sayısı ortalamasında azalma görülmüştür. BAP, KIN ve IAA bulunan ortamlardaysa BAP, KIN

konsantrasyonunun artırılmasıyla yaprak sayısı ortalamasında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Modifiye MS ortamının, 1.0 mg l^{-1} BAP+ 1.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} NAA ve 2.0 mg l^{-1} BAP+ 2.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} NAA içeren bazı kombinasyonlarında kardeşlenme ve kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 2.0 mg l^{-1} BAP+ 2.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} IBA ve 2.0 mg l^{-1} BAP+ 2.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} IAA içeren modifiye MS ortamının bazı kombinasyonlarında da sadece kardeşlenmenin meydana geldiği tespit edilmiştir.

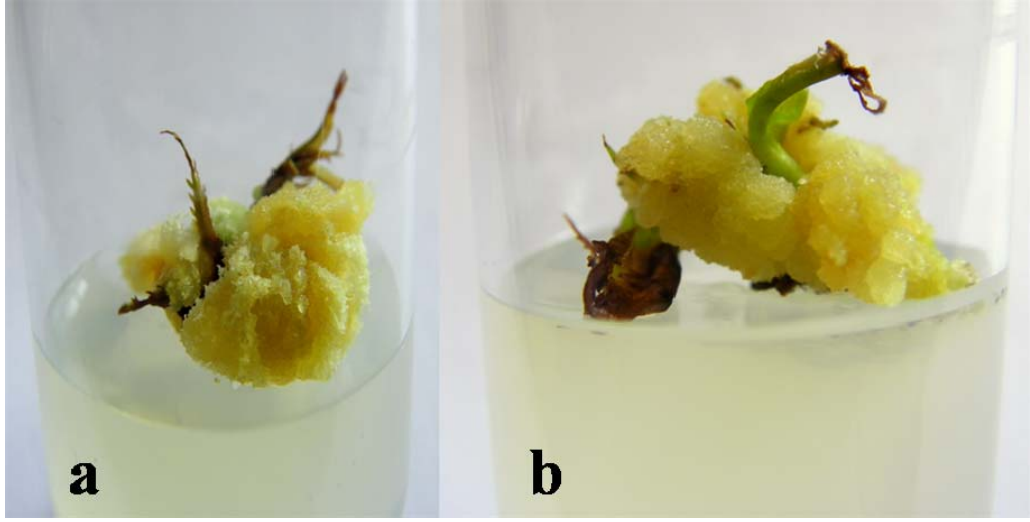


Şekil 4.4. Garnem anacının sürgün gözlerinin Sitokinin ve Oksin hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmasıyla oluşan sürgünleri **a, b:** 1.0 mg l^{-1} BAP+ 1.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} NAA içeren modifiye MS ortamı, **c, d:** 2.0 mg l^{-1} BAP+ 2.0 mg l^{-1} KIN+ 0.5 mg l^{-1} NAA içeren modifiye MS ortamı

4.3. *In vivo*' da Gelişen Garnem ve Myrobalan 29C Anaçlarında Köklendirme Çalışmaları

Köklenme amaçlı çalışmalarda Oksin ve Sitokinin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamı kullanılmıştır. Modifiye MS (%3 sakkaroz) ortamına Sitokinin (BAP) ve Oksin (NAA/IBA/IAA) hormonlarının değişen düzeylerindeki konsantrasyonları ($0.0, 1.0, 2.0, 4.0 \text{ mg l}^{-1}$) ilave edilerek sürgün gözleri kültüre alınmıştır. Kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra gerçekleştirilen değerlendirmede Garnem ve Myrobalan 29C anaçlarının eksplantlarında herhangi bir gelişme meydana gelmemiştir. Garnem' de az miktarda

kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). Oluşan kalluslar açık- sarı ve dağılabilen yapıda olmuştur.



Şekil 4.5. Köklenme ortamında kültüre alınan Garnem anacının sürgün gözü eksplantlarında oluşan kalluslar **a:** 2.0 mg l⁻¹ NAA + 1.0 mg l⁻¹ IBA + 0.1 mg l⁻¹ BAP içeren modifiye MS ortamı, **b:** 4.0 mg l⁻¹ NAA + 1.0 mg l⁻¹ IBA + 0.1 mg l⁻¹ BAP içeren modifiye MS ortamı.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Bitki doku kültürü, biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasında önemli aşamayı oluşturmaktadır. Ayrıca klonal çoğaltma yöntemlerinden biri olan çelikle üretimle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır. Tek bitkiden mevsime bağlı olmaksızın birden fazla bitki elde edilebilir. Köklenmesi zor olan bitkiler kısa zamanda üretilebilir. Ayrıca hastaliksız bitki elde etmede oldukça önemli bir yöntemdir.

Bu tez kapsamında, bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak Myrobalan 29C klon anacı ve Garnem (GN15) hibrit anacının klonal çoğaltımı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla Myrobalan 29C ve Garnem anaçlarının sürgün gözü, yaprak ve yaprak petiolü eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Sürgün teşvikini sağlamak amacıyla doğadan alınan eksplantlar üzerinde yapılan çalışmalarda Garnem ve Myrobalan 29C anaçlarının yaprak ve yaprak petiolü eksplantlarında herhangi bir gelişme olmamıştır. Ayan vd. (2005)' e göre, mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanması için uygun eksplant seçimi önemli ve temel faktörlerden biridir. *In vitro* sürgün oluşumu kullanılan eksplant tipine bağlı olarak değişmektedir. Canlı vd. (2008)'e göre, *Prunus* türlerinde rejenerasyon kabiliyeti, kullanılan doku tipi tarafından kuvvetli derecede etkilenmektedir. Rejenerasyon kabiliyeti bakımından, aynı türün farklı dokuları arasında çok büyük farklılıklar gözlemlenmiştir. Fakat bütün *Prunus* türlerinde kullanılabilen ve genel bir başarı sağlanabilecek ortak bir doku tipi mevcut değildir. Genellikle yaprak ve gövde parçaları, tohum kaynaklı dokulara göre daha güç rejenere olmaktadır.

Sürgün teşvikini sağlamak amacıyla kullanılan Myrobalan 29C anacının sürgün gözünde, KIN ve NAA içeren modifiye MS ortamında, bitki rejenerasyonu saptanmıştır. Garnem anacında ise, KIN ve NAA veya BAP ve IBA içeren MS ortamında kallus meydana gelmiştir.

Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinde en yüksek sürgün sayısı (3.00) ve en yüksek sürgün uzunluğu (18,67 mm), 4 mg l⁻¹ KIN içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. Sürgün uzunlukları arasında önemli bir fark olmamakla birlikte KIN konsantrasyonunun artırılmasıyla sürgün uzunluklarında artış meydana gelmiştir. KIN ve NAA hormonlarını beraber içeren ortama nazaran, sadece KIN hormonunu içeren ortamda ise sürgün sayısı artış göstermiştir. Bununla birlikte KIN ve NAA hormonlarını beraber içeren ortamlarda da KIN konsantrasyonunun artırılmasıyla sürgün sayısında artış meydana gelmiştir (Tablo 4.1.).

Kardeşlenme çalışmalarında, Myrobalan 29C anacının eksplantlarında en yüksek sürgün sayısı (4.778), 2.0 mg l⁻¹ BAP + 2.0 mg l⁻¹ KIN + 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. KIN, BAP ile NAA veya IBA eklenen ortamlarda KIN ve BAP seviyesinin artırılmasıyla sürgün sayısında artış meydana gelmiştir. KIN, BAP ve IAA eklenen ortamlarda ise KIN ve BAP konsantrasyonunun azaltılmasıyla sürgün sayısında artış meydana gelmiştir. En yüksek sürgün uzunluğunun ise (11.167 mm), 1.0 mg l⁻¹ BAP+1.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IBA içeren modifiye MS ortamında meydana gelmiştir (Tablo 4.2.). Bunun yanında oluşan sürgünlerin tabanında kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Oluşan kalluslar sert yapıda ve sarı renkte olmuştur.

Kardeşlenme çalışmalarında kullanılan Garnem anacının sürgün gözlerinde, en yüksek yaprak sayısı ortalaması (2.87) hormon içermeyen modifiye MS ortamında meydana gelmiştir. 1.0 mg l⁻¹ BAP+1.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ NAA ve 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ NAA içeren ortamlarda kardeşlenme ve kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IBA ve 2.0 mg l⁻¹ BAP+2.0 mg l⁻¹ KIN+0.5 mg l⁻¹ IAA içeren ortamlarda da sadece kardeşlenme saptanmıştır (Tablo 4.3.).

Arıcı (2008), Myrobalan 29C, GN, MaxMa 14, MaxMa 60, GF 677 anaçlarının sürgün uçları BAP, NAA, GA₃ içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı üzerinde kültüre alındığında ortamlar arasında bir fark gözlenmediğini rapor etmiştir. Bu çalışmada Myrobalan 29C için en fazla sürgün oluşumu 1 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA, GN için 1 mg l⁻¹ BAP + 0.02 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ GA₃, MaxMa 60 için 2 mg l⁻¹ BAP + 0.02 mg l⁻¹ NAA, MaxMa 14 için 2 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹

NAA + 0.5 mg l⁻¹ GA3, GF 677 için 1 mg l⁻¹ BAP + 0.02 mg l⁻¹ NAA içeren ortamlarda gözlemlenmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda, Myrobalan 29C anacı eksplantları KIN ve NAA içeren modifiye MS ortamında, Garnem anacı eksplantları KIN ve NAA, BAP ve IBA içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinde en iyi sürgün oluşumu 4 mg l⁻¹ KIN bulunan ortamda gözlemlenirken, Garnem anacının sürgün gözlerinde sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Canlı vd. (2008)' e göre, rejenerasyon bitkinin genotipi, doku türü, dokuların olgunluk durumu ve yaşı, büyümeyi düzenleyici maddeler ve bunların birbirlerine olan oranları, ışık rejimleri, yaralamalar, besin ortamındaki mineral tuzlar, ön muameleler gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Aynı türün farklı çeşitleri arasında rejenerasyon kabiliyeti ve yüzdesi bakımından önemli farklılıkların gözlemlenebildiği belirtilmiştir.

Miachir vd. (2004)'e göre, mikroçoğaltım BAP bağımlıdır ve yüksek NAA konsantrasyonlarında sürgün oluşumu engellenir. BAP'in düşük NAA konsantrasyonları ile birlikte kullanılmasının sürgün oluşumunu artırdığı belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda Garnem anacı sürgün gözleri KIN ve NAA veya BAP ve IBA içeren ortamlarda sürgün teşviki için kültüre alınmıştır. Fakat iki ortamda da sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Myrobalan 29C anacının sürgün gözleri ise sadece KIN ve NAA hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Gerek KIN hormonunun yalnız bulunduğu ortamda, gerekse KIN ve NAA hormonlarının birlikte bulunduğu ortamlarda sürgün rejenerasyonu meydana gelmiştir. Bununla birlikte KIN ve NAA hormonunun birlikte bulunduğu ortamlara nazaran KIN hormonunun yalnız bulunduğu ortamlarda sürgün uzunluğu artmıştır. Bu sonuç mikro çoğaltımın kullanılan hormonlara bağlı olduğu kadar kullanılan bitkilerin tür ve genotiplerine de bağlı olduğunu göstermektedir.

Gürel ve Gülşen (1998a), yaptıkları çalışmada, Texas ve Nonpareil (*Amygdalus communis L.*) badem çeşitlerinin *in vitro* vegetatif çoğaltımında farklı IBA ve BAP düzeyleri kullanmışlardır. Sürgün gelişimi için en iyi ortamın hormon içermeyen veya düşük düzeyde IBA (0.1 mg l⁻¹) içeren ortamlar olduğu belirtilmiştir.

Channuntapipat vd. (2003), bademde (*Prunus dulcis*) ve badem x şeftali (Titan x Nemaguard) anaçlarında mikroçoğaltım üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu amaçla Nonpareil 15-1 ve Ne Plus Ultra çeşitlerinin yaklaşık 0.7 cm uzunluğunda 3-5 yapraklı sürgün uçlarının mikro çoğaltımı için farklı IBA ve BAP konsantrasyonu kullanılmıştır. Eksplant kültürleri farklı oranlarda sakkaroz ve % 0.7 agar eklenen ortamlarda yapılmıştır. Nonpareil 15-1, 0.049 mM IBA, 3mM BAP, 0.058 M sakkaroz bulunan Almehdi and Parfitt (AP) ortamından etkilenirken, Ne Plus Ultra için 0.049 mM IBA, 5mM BAP, 0.088 M sakkaroz bulunan MS ortamlarının uygun olduğu bildirilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda, IBA ve BAP düzeylerinin birlikte kullanıldığı denemelerde veya BAP' in tek başına kullanıldığı denemelerde Garnem hibrit anacında sürgün meydana gelmemiştir. Bu farklı sonuçlara, kullanılan çeşitlerin farklı olması, doku kaynağı olarak kullanılan organın fizyolojik yaşı, eksplantın bitkiden alındığı dönem, eksplantın büyüklüğü ve eksplantın yetiştirme şartları (serada, doğal ortamda, *in vitro*'da yetiştirilmesi gibi) neden olmuş olabilir (Babaoğlu vd., 2001). Bunun yanı sıra farklı firmalardan elde edilen kimyasalların farklılıkları, farklı ortamların kullanılması, kullanılan sakkaroz oranları gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Gürel ve Gülşen (1998b), bademde (*Amygdalus communis L.*), Texas ve Nonpareil çeşitlerinin sürgün uçlarını kullanarak, farklı sakkaroz, agar ve pH düzeylerinin *in vitro* sürgün verimine etkilerini incelemişlerdir. % 5 ve % 6 sakkaroz dozlarının proliferizasyonu uyardığı, % 0.5 veya % 6 sakkaroz ile pH 5.5 ise en iyi eksplant gelişmesinin sağlandığı belirtilmiştir. Yüksek sakkaroz ve agar dozlarının sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumunu artırdığı rapor edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda % 3 sakkaroz, 8 g l⁻¹ agar kullanılmış ve pH 5.7' ye ayarlanmıştır. Gürel ve Gülşen (1998b)' nin yaptıkları çalışma ile paralel olarak kurulan tüm denemelerde azda olsa kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca kardeşlenme çalışmalarında Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinin tabanlarında kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Canlı vd. (2008) tarafından *Prunus* türlerinin rejenerasyon kabiliyetinin kullanılan doku tipi tarafından etkilendiği bildirilmiştir. Bütün *Prunus* türlerinde kullanılabilen ve genel bir başarı sağlanabilecek ortak bir doku tipinin mevcut olmadığı

vurgulanmıştır. Ayrıca, *In vitro*'da kullanılan standart tuz karışımlarının, rejenerasyonu etkileyen etmenlerden biri olduğu belirtilmiştir. QL (Quoirin&Lepoivre) tuzlarının özellikle *Prunus* türleri için geliştirildiği, B5 tuzlarının ise rejenerasyonu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. QL ortamı diğer ortamlarla karşılaştırıldığında orta seviyede makro tuz içeriğine ve düşük konsantrasyonlarda amonyuma sahiptir. Amonyum iyonlarının, hücreye toksik etkiye bulunduğu kaydedilmiştir. Yağcı vd. (2008)' e göre, bitki doku kültürü ortamları olan MS ve B5' te azot kaynağı olarak nitrat ve amonyum tuzları bulunmaktadır. Bu tuzların miktarlarındaki değişiklikler hem kallus oluşumunu hem de sürgün oluşumunu etkilemektedir. Stamp ve Meredith (1988)'e göre kullanılan besin ortamları *in vitro* kültürlerde sonucu etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Werbrouck ve Debergh (1994), MS ortamının birçok bitki için hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltımında kullanılması ve iyi sonuçlar elde edilmesine karşın, bu ortamdaki tuzların oranının bazı bitkiler için toksik etki yapmakta olduğunu ya da fazla geldiğini belirtmişlerdir. Bu bitkiler ve odunsular için Woody Plant Medium (WPM) ya da Lepoivre ortamının alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Bu raporlara paralel olarak; Espinosa vd. (2006), *Prunus serotina* Ehrh.'nin üç genotipinin *in vitro* yaprak eksplantlarını, 0.0, 0.54, 1.07, 5.37 μ M NAA ve 0.0, 4.44, 8.88, 13.32 μ M BA kombinasyonları ile tamamlanan WPM ve 0.0, 0.54, 1.07, 5.37 μ M naphthalenacetic acid (NAA), 0.0, 2.27, 4.54, 6.81 μ M TDZ ile tamamlanan WPM ortamında kültüre almışlardır. TDZ ve genotipin, sürgün rejenerasyonu sayısında önemli bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Maksimum ortalama sürgün sayısı rejenerasyonu her bir eksplantta (5.05 ± 1.14) 2.27 μ M TDZ ve 0.54 μ M NAA içeren ışık uygulamasından sonra 3 hafta boyunca karanlık klima odasında kültüre alınan ortamdan elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu oranı (38.8) ve ortalama sürgün sayısı (4.13 ± 0.97) 6.81 μ M TDZ ve 1.07 μ M NAA içeren ortam üzerinde sağlanmıştır. Yan sürgünlerde en fazla köklenme (27%) ve kök sayısı (2.3 ± 0.2), 2.5 μ M IBA içeren ortamlarda meydana gelmiştir. Stok kültürlerden elde edilen nodal eksplantlarda en yüksek köklenme (70%) ve her bir sürgünün kök sayısı (2.7 ± 0.9) 2.5 μ M IBA içeren ortamlardan, 16 saatlik fotoperiyota transfer edilmeden önce 4 gün boyunca karanlıkta muhafaza edilen sürgünlerde elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında, tüm denemeler süresince, ortam olarak makro, mikro besin elementleri ve Gamborg B5 vitaminlerini içeren modifiye MS ortamı kullanılmıştır. Modifiye MS ortamının Garnem ve Myrobalan 29C üzerinde farklı etkilere sahip olmasıyla birlikte, kullanılan dokulara da farklı etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan bu farklılıklar, her bitkinin farklı elementlere farklı miktarlarda ihtiyaç duymasından kaynaklanmış olabilir.

Köklenme çalışmalarında, modifiye MS ortamına % 3 sakkaroz, 8 g l⁻¹ agar eklenmiş, BAP (0.1 mg l⁻¹) ve NAA/IBA/IAA (1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹) hormonlarının değişen düzeylerdeki konsantrasyonları ilave edilerek sürgün gözleri kültüre alınmıştır. Fakat Garnem anacı ve Myrobalan 29C anacı eksplantlarında kök oluşumu meydana gelmemiştir.

Ainsley vd. (2001), sert çekirdeklilerden bademin (*Prunus dulcis Mill.*) sürgün kültürlerinde, IBA ve NAA' in farklı konsantrasyonlarını kullanmışlar ve köklenmede optimum Oksin konsantrasyonunu belirlemek için IBA ve NAA konsantrasyonlarını karşılaştırmışlardır. En iyi köklenme Oksin bulunmayan fakat 100 µM PG (phloroglucinol) içeren bazal ortamın ardından 1.0 mM IBA ve 0.6 % agar içeren ortamlara sürgünlerin aktarılmasıyla elde edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda IAA, IBA ve NAA konsantrasyonlarına (0.0, 1.0, 2.0,4.0 mg l⁻¹) ilave olarak 0.1 mg l⁻¹ BAP eklenmiş ve Garnem anacında veya Myrobalan 29C anacında köklenme meydana gelmemiştir. Ainsley vd. (2001) 'nin yaptığı çalışma ile bizim yaptığımız çalışma arasındaki farkın sebebi, PG uygulaması ve kullanılan anaçların farklılığı olabilir.

Pierik (1987)' e göre, alt kültür sayısı ile köklenme arasında ilişki vardır. Alt kültür sayısının artması ile köklenme oranını arttırmaktadır ve sürgün büyüklüğü köklenmeyi arttırmaktadır. Tarafımızdan yapılan çalışmalarda kültüre alınmayı takiben 4 hafta sonra değerlendirmeler yapılmıştır. Kültürlerin, alt kültürlere transferleriyle sürgünlerin uzunlukları artırılabilir ve eksplantlarda kök oluşumu sağlanabilir. Ayrıca bu tez kapsamında kurulan denemelerin bazılarında *in vivo*'da yetişen sürgünlerin uzunlukları artırıldıkça gelişim hızlarının ve sürgün uzunluklarının artmakta olduğu görülmüştür.

Shekafandeh (2010), iki badem çeşidinde (Shahrood 8 ve Shahrood10) farklı Oksin ve Sitokinin hormonlarının etkisini incelemiştir. Ortamlara farklı konsantrasyonlarda NAA ve IBA hormonları ve 1.5-2 mg l⁻¹ BA eklemiştir. NAA ve IBA uygulanan sürgünlerin tabanlarında kallus oluştuğu, IBA uygulaması ile kompakt kallusların meydana geldiği rapor edilmiştir. İki Oksin tipi karşılaştırıldığında, IBA uygulanan sürgünlerde köklenme geliştiği vurgulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada pH'nın köklenmeye etkisi araştırılmış ve pH seviyesinin köklenmede önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Shahrood 8' in pH 5.7 iken 70 % oranında, Shahrood 10' un sürgünlerinin pH 4.8 iken 60 % oranında kök oluşturduğu belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, pH 5.7' ye ayarlanmış ve Shekafandeh (2010)' ın yaptığı çalışmayla paralel olarak kültüre edilen sürgünlerin tabanlarında kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Kalluslar kahverengi ve sert yapıda meydana gelmiştir (Şekil 4.3.).

Channuntapipat vd. (2003), badem x şeftali hibrit anacı (*Prunus dulcis* cv. Titan x *Prunus persica* cv. Nemaguard) çeşidi olan Nonpareil 15-1 ve Ne Plus Ultra' nın 2 cm uzunluğundaki kültürlerini kullanmışlardır. Kültürlerde, 2.4 mM IBA, 0.088 M sakkaroz ve % 0.7 agar eklenip pH 5.7' ye ayarlanan MS ortamlarında, 2 hafta ışıklı, 1 hafta karanlık koşullarda % 88 oranında kök gelişiminin meydana geldiği belirtilmiştir. Gelişen bitkiler Nonpareil (15-1)'de % 50, Ne Plus Ultra'da ise % 65 oranında canlılıklarını devam ettirmişlerdir. Werbrouck ve Debergh (1994), yüksek şeker konsantrasyonunun (% 3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırdığını belirtmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda, 30 g l⁻¹ sakkaroz ile Oksin ve Sitokinin hormonlarının kombinasyonlarını içeren modifiye MS ortamı üzerinde Garnem ve Myrobalan 29C anaçlarının sürgün gözleri kültüre edilmiştir. Besi yerlerine aktarılan eksplantlar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık, 24±2 °C sıcaklıktaki iklim odasında kültüre alınmış, 4 hafta sonra iklim odasında bekletilen kültürlerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Kültüre edilen, Garnem anacının sürgün gözlerinde sürgün teşviki veya köklenme meydana gelmemiştir. Myrobalan 29C anacının sürgün gözlerinde ise sürgün oluşumu meydana gelirken, köklenme meydana gelmemiştir. Channuntapipat vd. (2003) ile tarafımızdan yapılan çalışmalar arasındaki farklar kullanılan anaçların farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2004), Yunanistan' ın Pomology Enstitüsünde selekte edilmiş olan şeftali x badem hibriti PR 204/84 (*Prunus persica x Prunus amygdalus*) anacını kullanmışlardır. Eksplantlar, karbon kaynağı olarak glukoz veya sakkarozun farklı konsantrasyonları kullanılarak kültüre alınmıştır. Her bir MS ortamına glukoz veya sakkarozun yanında 5 µM IBA eklenmiştir. PR 204/84'ün *in vitro* kültürlerinde en fazla köklenme ve ortalama kök sayısının 88 mM sakkaroz veya glukoz içeren ortamlarda meydana geldiği bildirilmiştir. Kültür ortamlarına farklı şekerlerin ilavesinin, sürgün çoğaltımı potansiyelini artırabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca ortamların kapatılmasında kullanılan parafilm, kauçuk, pamuk ve alüminyum folyo gibi onaylanan materyallerin köklenmeye etkisi araştırılmıştır. Parafilm, kauçuk, alüminyum folyo materyallerinin köklenme oranında önemli bir fark yaratmadığı bildirilmiştir. Pamuk kullanımının ise her bir sürgünde en düşük kök sayısına, kök uzunluğuna sebep olduğu belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında tarafımızdan yapılan köklenme çalışmasında karbon kaynağı olarak 3 % sakkaroz kullanılmıştır. Garnem veya Myrobalan 29C için kurulan sürgün teşviki, kardeşlenme ve köklenme denemelerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Garnem veya Myrobalan 29C anaçlarında kök oluşumu üzerine glukoz konsantrasyonlarının etkisi araştırılabilir.

Perez-Tornero vd. (1999), bazı kayısı çeşitlerinin (Canino, Currot, Bulida ve Bergeron) sürgünlerini köklendirmek için 9.8, 19.6, 29.4 µM konsantrasyonlarında IBA kullanmışlardır. Bulida' nın en az sürgün sayısı ve en düşük verimlilik gösterdiği belirtilmiştir. Bütün denemelerde ortalama olarak Helena'da % 60, Canino'da % 73.5, Lorna'da ise % 60.3 oranında kök gelişiminin meydana geldiği belirtilmiştir. Bununla birlikte sürgünlerin çoğunun apikal nekrozis gösterdiği rapor edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda, NAA, IBA, IAA ve BAP hormonları farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Fakat Garnem anacının veya Myrobalan 29C anacının sürgün ucu eksplantlarında kök oluşumu meydana gelmemiş, eksplantların tabanında kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Mariska vd. (1991)'e göre, sürgün gelişimi ortamlarında Sitokinin hormonunun varlığı kök gelişimini engellemektedir. Tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından sonra farklı hormon kompozisyonuna sahip olan yeni bir

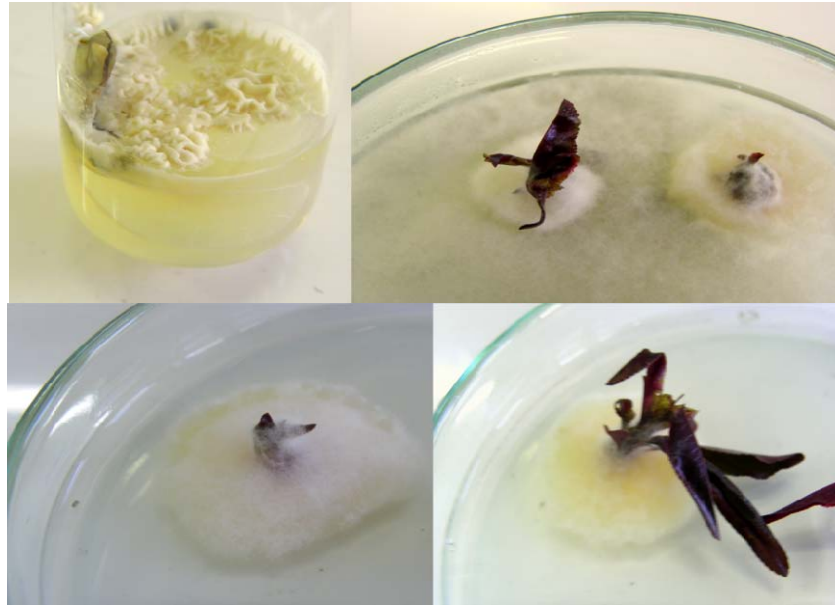
ortama aktarılmalıdır. Sürgünler belirli bir uzunluğa eriştikten sonra köklenmeleri amacıyla köklenme ortamına alınmalıdır. Werbrouck ve Debergh (1994) , bitki dokularından organ farklılaşmasında Oksin ve Sitokininler önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/Oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, Oksin/Sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, Oksin/Sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. Bhojwani ve Razdan (1983)'a göre, doku kültürü çalışmalarında kullanılan Oksin ve Sitokinin hormonlarının etkileri, üzerinde çalışılan türlere göre değişmektedir. Mikroçoğaltımda, sürgün çoğaltımının artırılması, uygun konsantrasyonda ve tipte Sitokinin içeren (Oksinli ya da Oksinsiz) besin ortamlarında sağlanmaktadır. Borkowska ve Szczerba (1991), kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile konsantrasyonlarının kültür aşamasına ve bitki türüne göre farklılık gösterdiğini belirtmiştir.

Antonopoulou vd. (2007), şeftali hibrit anacı GF-677 (*Prunus amygdalus*×*Prunus persica*) kullanarak anaçların *in vitro* köklenmesinde demirin şelat formu olan ethylendiamine di-o-hydroxyphenylacetic (Fe-EDDHA) (%6 Fe) tuzunun etkilerini araştırmışlardır. Ethylendiamine tetraacetic acide (Fe-EDTA) tuzlarının yerine koyulan Fe-EDDHA' nın 3 konsantrasyonu kullanılmıştır: 93.5, 187.0, 280.5 mg l⁻¹ (sırasıyla; 5.6, 11.2, 16.8 mg l⁻¹ Fe). Her bir Fe-EDDHA uygulaması için 4 farklı konsantrasyonda (0, 0.1, 1.0, 10 mg l⁻¹) eklenen askorbik asidin etkisi çalışılmıştır. Eksplantlar en iyi köklenmeyi 280 mg l⁻¹ Fe-EDDHA' da verdiği belirtilmiştir. Askorbik asidin köklenmeye net olmayan bir etkisi olduğunun gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, modifiye MS ortamı kullanılmıştır ve bu ortam Fe-EDTA içermektedir. Eksplant kaynaklarında köklenme meydana gelmemiştir. Bitki materyallerinin alındığı zamanlardaki dönemsel faktörler, çalışmada kullanılan bitkilerin genotipi, bitkilerin ihtiyaç duydukları elementlerin ortamdaki miktarları köklenmenin oluşmamasına sebep olmuş olabilir.

Bu çalışmalarda en sık karşılaşılan engel kontaminasyon olmuştur. Sterilizasyon yöntemleri birçok defa değiştirilmesine rağmen özellikle kış aylarında (kasım, aralık, ocak, şubat) alınan eksplantlarda kontaminasyon oranı oldukça artmıştır (Şekil 5.1.). İlkbahar ve yaz aylarında eksplantlar 30 dakika akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra 1.5%' lik sodyum hipokloritin içerisinde 10 dakika bekletilip, 3 defa

dH₂O ile alkanıp kurutma kağıdı ile kurutma yapılması, eksplantların sterilizasyonu için yeterli olmuştur. Yaz aylarının son dönemlerinde ise, eksplantlar akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra deterjanla alkama yapılmış veya 96%'lık etanolda bekletildikten sonra yine aynı işlemlere tabi tutularak sterilizasyonda başarı sağlanmıştır. Kış aylarında ise bu sterilizasyon yöntemleri yeterli olmayıp neredeyse kültürlerin hepsinde, özellikle bitki materyallerinin çevresinde oluşmaya başlayan kontaminasyon kaydedilmiştir. Bu sebeple sterilantların konsantrasyonu ve sterilantlar içerisinde bitki materyallerinin kalma süresi artırılmıştır. Sterilantların konsantrasyonlarını ve sterilant içerisinde bitki materyallerinin kalma süresini artırdıkça bitki materyallerinde yanma (kahverengileşme) meydana gelmiş, fakat bulaşıklık önlenememiştir.



Şekil 5.1. MS ortamı üzerinde kültüre alınan eksplantlarda kontaminasyon

Kontaminasyonların özellikle bitki eksplantı çevresinde oluşmaya başlaması bulaşıklık sebebinin bitki kaynaklı olabileceğini göstermektedir. Kontaminasyon, sterilantların sürgün gözlerindeki yaprakçıklara iyi nüfus edememesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca sonbahar ve kış aylarında fungus sporlarının sürgün gözlerine yerleşmiş olması kontaminasyona artırmış olabilir.

Bitkilerin yüzey sterilizasyonları doku kültürü işlemleri arasında en önemli aşamalardan biridir. Yüzey sterilizasyonu için kullanılan en önemli maddeler etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen

peroksittir. Ayrıca sterilizasyon amacıyla biyositler de kullanılabilir. Ticari solüsyon en az % 5 sodyum hipoklorit (NaOCI) içermeli ve yüksek saflıkta olmalıdır. En fazla % 20-30 oranında ticari solüsyon içeren karışımlar kullanılmaktadır. Bütün sterilizasyon solüsyonlarında özellikle yaprak ve gövde gibi sterilizasyonunda kullanılacak solüsyonlarda 100 ml solüsyon için yüzey gerilimini azaltması için 2 damla Tween- 20 kullanılmalıdır (Babaoğlu vd., 2001). Tarafımızdan yapılan çalışmalarda, sodyum hipoklorit (NaOCI), etil alkol ve fungusit (bakırlı preparat) kullanılmıştır.

Perez-Tornero vd. (1999), tarafından bademin mikro çoğaltımı üzerinde yapılan çalışmalarda aralık-şubat ayındaki dormant gözler kullanılmıştır. Bademde yan (aksillar) sürgünlerde çok fazla kontaminasyon saptandığı vurgulanmıştır (% 83). Sterilizasyon amacıyla 2 veya 3 göz içeren sürgünler su ve deterjan içeren solüsyonda yıkanmıştır. 5 dakika % 70' lik etanolda tutulmuştur. Daha sonra 20 dakika boyunca % 0.8 NaOCI içeren % 20' lik domestos solüsyonu içerisinde sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilizasyonu takiben eksplantların 3 kez steril su ile yıkanmıştır. Arazi koşullarında yetiştirilen meyve ağaçlarında mikroorganizma gelişmesi meydana gelebileceği belirtilmiştir. Bu bitkilerde gelişen mikroorganizmalar *in vivo* koşullarda bitkiye zarar vermeyebileceği, fakat bu tip bitkilerden alınan eksplantlar besin elementlerince zengin ortamlarda kültüre alındığında bakteri ve fungus sporları hızlı bir gelişim göstereceği rapor edilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmalarda da bu çalışmaya paralel olarak özellikle kasım, aralık, ocak, şubat aylarında kültüre edilen bitkilerde çok sık (90 %) kontaminasyon meydana gelmiştir. Kullanılan sterilantların oranları ve bitki materyalinin sterilant içerisinde bekleme süresi artırıldıkça bitki materyalinde kahverengileşmeler meydana gelmiştir.

Leifert ve Cassells (2001), mikro organizmalar (funguslar, bakteriler virüsler ve viroidler) ve mikro artropodlar (tripsler ve akarlar)' ın bitki doku kültüründe kontaminasyona neden olabileceğini bildirmişlerdir. Bu tip kontaminasyonların, doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantlarla, laboratuvar çalışmalarıyla veya mikroartropod vektörleri aracılığıyla meydana getirilebileceği belirtilmiştir. Kontaminasyonların, kültüre alınmayı takiben gelişebileceği veya uzun bir süre latent kalabileceği vurgulanmıştır. Birçok bitki türünde dezenfeksiyon protokolleri

geliştirilmiş; antibiyotik ve fungusit kullanımı bakteri ve fungus kontaminasyonlarının engellenmesinde kullanılmasına rağmen bu tip bulaşıklıklar önemli problemler oluşturabilmekte olduğu kaydedilmiştir. Özellikle gram negatif bakterilerin kontrolü doku kültürü çalışmalarında başarısız olduğu rapor edilmiştir.

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkiler, tek bir hücreden, doku veya organlardan tam bir bitkiyi oluşturma (totipotensi) ve farklılaşma yeteneğine (kompotens) sahiptir. Bu özelliklerinden yararlanılarak doku kültürü yöntemiyle bitkilerin genetik yapılarını değiştirmeden klonal çoğaltımlarını yapmak mümkündür. Doku kültürünün üreticiye sağladığı en büyük avantaj damızlık olarak seçilen bitkinin, genetik özellikleri bakımından, aynısını üretmektir. Ayrıca bitki materyalinin gereksinim duyulan sayıda, kısa sürede ve mevsime bağlı olmaksızın üretilmesini sağlar. Özellikle üretimi *in vivo* koşullarda zor olan bazı türlerin üretilmesinde ve türlerin kaybolmasını önlemekte önemli bir yöntemdir.

Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, Garnem (GN15) hibrit anacı ve Myrobalan 29C klon anacının yaprağı, yaprak petiolü ve sürgün gözleri *in vitro* koşullarda kültüre alınmıştır ve Garnem anacının etkin bir şekilde üretimi yapılamazken, Myrobalan anacının üretimini sağlayabilecek koşullar belirlenmiştir.

1. Myrobalan 29C anacının, KIN ve NAA (0.0, 0.5, 2.0 4.0 mg l⁻¹) hormonlarını içeren modifiye MS ortamında başarılı bir şekilde çoğaltımı yapılmıştır. Garnem anacının ise mikro çoğaltım çalışmalarının devam etmesi gerekir.
2. BAP, KIN, NAA, IBA, IAA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹) hormonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınan Myrobalan 29C anacı sürgün gözlerinde ortalama 3 kardeş meydana gelirken, Garnem anacında kallusla birlikte yaprak sayısında artış meydana gelmiştir.
3. Myrobalan 29C anacı ve Garnem anacında kök oluşumu sağlanamamıştır. Alt kültür çalışmaları yapılarak, farklı karbon kaynakları ve büyüme düzenleyicileri ilave edilerek köklenme sağlanabilir. Ayrıca, kök gelişimi üzerine ortamın fiziksel koşullarının etkisi (ışık şiddeti gibi) üzerinde araştırmalar yapılabilir.

4. Bu tez kapsamında kurulan denemelerin bazılarında *in vivo*'da yetişen sürgünlerin uzunlukları artırıldıkça gelişim hızlarının ve sürgün uzunluklarının artmakta olduğu görülmüştür. Özellikle Garnem anacının mikro çoğaltım çalışmalarında 2-4 cm uzunluğundaki sürgünler kullanılabilir.
5. BAP ve IBA (0.0, 0.5, 2.0, 4.0 mg l⁻¹) veya BAP, KIN, NAA, IBA, IAA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹) kombinasyonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınan Garnem anacı sürgün gözlerinde sert yapıda, kırılğan kalluslar meydana gelmiştir. Oluşan kalluslar hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir.

Kullanılan hormonların Myrobalan 29C ve Garnem anaçlarına farklı etkilerde bulunduğu belirlenmiştir. Her bitki için farklı ortamlar ve farklı hormon çeşitleri etkili olabilmektedir. Kullanılan hormonların çeşitleri veya konsantrasyonları ve kombinasyonları değiştirilerek, bitki genotipine bağlı olmak üzere, farklı sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

Ainsley, P. J., Collins G. G., Sedgley, M. (2001). In vitro Rooting of Almond (*Prunus dulcis*MILL.). *In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant*, **37**, 778–785.

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C., Papadakis, I. (2007). The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in vitro rooting of the peach rootstock GF-677 explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **29**, 559–561.

Arıcı, S. E. (2008). Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının Doku Kültürü ile Çoğaltılması *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **3(1)**, 19-23.

Ayan, A.K., Çırak, C., Kevseroglu, K. ve Sökmen, A. (2005). Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforata* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **29**, 197-204.

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Eds.). (2001). Bitki Biyoteknolojisi-1-Doku kültürü ve uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*.

Borkowska, B. and Szczerba, J. (1991) Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. *Journal of Experimental Botany*, **240(42)**, 911 - 915.

Boyacıoğlu, D. (1994). Geçmişte ve Günümüzde Gıda Biyoteknolojisi Uygulamaları. II. Gıda Mühendisliği Kongresi, Kimya Mühendisleri Odası ve Gaziantep Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gaziantep.

- Bhojwani, S.S., Razdan M.K. (1983). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*.
- Canlı, F A, Karakurt, Y., Yılmaz, Ö. (2008). Advances and Future Perspectives in Genetic Transformation of Prunus Species. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 30-38.
- Cassel, AC. (1993). Problems in Tissue Culture: Culture Contamination. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), *Micro propagation – Technology and Application*, pp. 15-31, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M., Collins, G. (2003). Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan×Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, **98**, 473–484.
- Demirsoy, H., Macit, İ. (2007). Meyve Ağaçlarında Bodurluk Mekanizması. *Journal of Faculty of Agriculture. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **22(2)**, 214-218.
- Dziedzic, E., Malodabry, M. (2006). Vegetative Cherry Rootstocks in Tissue Culture. Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. *Sodininkyste ir Darzininkyste*, **25(3)**, 77-84.
- Espinosa, A. C., Pijut, P. M., Michler C. H. (2006). Adventitious Shoot Regeneration and Rooting of Prunus serotina in vitro Cultures. *Hortscience*, **41(1)**, 193-201.
- Fotopoulos, S., Sotiropoulos, T.E. (2004). *In vitro* Propagation of the Peach Rootstock: the Effect of Different Carbon sources and Types of Sealing Material on Rooting. *Biologia Plantarum*, **48(4)**, 629-631.
- Gürel, S., Gülsen, Y. (1998a). The Effects of IBA and BAP on In Vitro Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis L.*). *Turkish Journal of Botany*, **22**, 375-379, TÜBİTAK.

Gürel, S., Gülsen, Y. (1998b). The Effects of Different Sucrose, Agar and pH Levels on In Vitro Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis L.*). *Turkish Journal of Botany*, **22**, 363-373, TÜBİTAK.

Hepaksoy, S. (2004). Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar I. Gelişme ve Çoğalma. *Ege Üniviversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **41(3)**, 11-22.

Işıkalın, Ç., Adıyaman Akbaş, F., Namlı, S., Tilkat, E., Başaran, D. (2008). *In vitro* Micropropagation of Almond (*Amygdalus communis L. cv. Nonpareil*). *African Journal of Biotechnology*, **7(12)**, 1875-1880.

İnternet:<http://zmo.org.tr>

İnternet:<http://wikipedia.org>

İnternet:<http://dpt.gov.tr/planlama>

İnternet:<http://fitotechniki.com>

Kalinina, A., Brown, D. C. W. (2007). Micropropagation of Ornamental *Prunus* spp. and GF305 Peach, a *Prunus* Viral Indicator. *Plant Cell Reports*, **26**, 927–935.

Kankaya, A. (1998). Bazı Klon Anaçlarının Fidancılığımızdaki Önemi. *Ege Bölgesi 1. Tarım Kongresi Bildirileri*, **1**, 32-39.

Kankaya, A. ve Özyığı, S. (1998). Bazı Klon Anaçlarının Çelikle Çoğaltılabilirliği. *Ege Bölgesi Tarım Kongresi*, Aydın. Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma (Sonuç Raporu).

Leifert, C., Cassells, A. C. (2001). Microbial Hazards in Plant Tissue and Cell Cultures. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, **37**, 133-138.

Liu, X., Pijut, P. M. (2008). Plant Regeneration from *in vitro* Leaves of Mature Black Cherry (*Prunus serotina*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **94**, 113–123.

MEGEP (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi). (2007). Bahçecilik, *Aşıyla Üretim*, Ankara.

Miachir, J.I., Romani, V.L.M., de Campos Amaral, A.F., Mello, M.O., Crocomo, O.J. and Melo, M. (2004). Micropropagation and callogenesis of *Curcumazedoaria* Roscoe. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.), **61(4)**, 427-432.

Murashige T., Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.

Nas, M. N., Read P. E.A. (2004). Hypothesis for the Development of a Defined Tissue Culture Medium of Higher Plants and Micropropagation of Hazelnuts. *Scientia Horticulturae*, **101**, 189–200.

Ning, G. G., Fan, X. L., Huang, W. J., Bao, M. Z., ve Zhang J. B. (2007). Micropropagation of Six *Prunus Mume* Cultivars Through Axillary Shoot Proliferation, and ISSR Analysis of Cloned Plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **49(1)**, 25–31.

Özkarakaş, İ. (2008). Bodur Meyve Yetiştiriciliğinde Anaçlar ve Önemi. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü*. Yayın No:133.

Pérez-Tornero, O., Burgos, L., Egea, J. (1999). Introduction and Establishment of Apricot *in vitro* Throught Regeneration of Shoot from Meristem Tips. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, **35**, 249-253.

Pierik, R.L.M. (1987). *In vitro* culture of higher plants. *Mortinus Nijhoff Publishers*, Dordrecht.

Pevalek-Kozlina, B., Michler, C. H., Jelaska, S. (1994). Microclonal Multiplication OF Wild Cherry (*Prunus avium* L.) from Shoot Tips and Root Sucker Buds. *Acta Botanica Croatica*, **53**, 31-38.

Pruski K., Astatkie T., Nowak J. (2005). Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **82**, 207–211.

Shekafandeh, A. (2010). The Effects of Ph Levels and Plant Growth Regulators on *in vitro* Regeneration of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). *World Applied Sciences Journal*, **8(11)**, 1322-1326.

Stamp, J.A., Meredith, C.P. (1988). Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine. *Scientia Horticulturae*, **35**, 235-250.

Şahin, T. (2003). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji. *Sümae Yunus Araştırma Bülteni*, **3**, pp. 1.

Yağcı, C., Toker, M. C., Toker, G. (2008). Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler. *Türk Bilim Derneği Dergisi*, **1**, 47-58.

Yalçın Mendi, N. Y. (2008). Kocaman, E., Ünek, C., Eldoğan, S., Çürük, P., Gencil, G., Serçe, S., Begonia semperflorens'in Direk Organogenesis Yöntemiyle Rejenerasyonu. *Alatarım*, **7(2)**, 9-13.

Werbrouck, S.P.O., Debergh, P.C. (1994). Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). Plant Cell Culture – A Practical Approach, Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) *Oxford University Press*, 127-135.

EK 1

Kültür Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg l⁻¹)

KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	22.3
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3
Nikotonik asit	1.0
Pridoksin-HCl	1.0
Thiamin-HCl	10.0
<i>myo</i> -inositol	100
Sakaroz	30000

EK 2. Stok Solüsyonlar

Kimyasallar	Oranlar (mg/100ml)
A. H ₃ BO ₃	62
KH ₂ PO ₄	1700
KI	8.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4400
B. MgSO ₄ ·7H ₂ O	3700
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	169
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	86
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
C. FeSO ₄ ·7H ₂ O	278
Na ₂ -EDTA	373
D. Nikotonik Asit	10
Pridoksin-HCl	10
Thiamin-HCl	100

EK 3. Sonradan ilave edilen kimyasallar

Kimyasal	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
<i>myo</i> -inositol	100
Sakaroz	30000
Agar	8-10 g