

154711

BADEMİN (*Amygdalus vulgaris L.*) KLONAL OLARAK ÇOĞALTILMASI

Yüksek Lisans Tezi




Biyoloji Bölümü
Gaziantep Üniversitesi

Narin Haki YAPAR

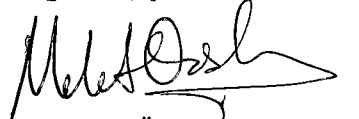
Eylül 2004

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı


Prof. Dr. Osman ERKMEN


FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/~~Doktora tezi~~ olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Bölüm Başkanı

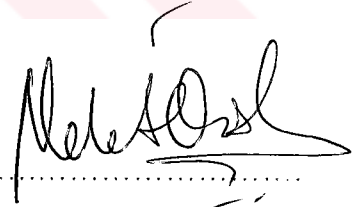
Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans /
~~Doktora tezi~~ olarak kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Canan CAN

Danışman

Sınav Jüri Üyeleri

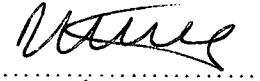
Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN



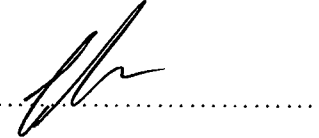
Doç. Dr. Yusuf ZEYNELOV



Doç. Dr. Elman İSKENDER



Yrd. Doç. Dr. Canan CAN



Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ



ÖZ

Prunus amygdalus L.'NİN İN VİTRO DOKU KÜLTÜR TEKNİKLERİ KULLANILARAK ÇOĞALTILMASI

YAPAR, Narin Haki

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Canan CAN

Eylül, 2004, 40 sayfa

Badem (*Prunus amygdalus* L.) Gaziantep'te doğal bir yayılış alanı bulan ve yetiştiriciliği yapılan bir türdür. Son dönemlerde bazı hibrit çeşitlerin bölgeye adaptasyon çalışmaları yapılmakta, aşı ile üretimi kolay olan bir bitki olmasına rağmen bu çeşitlerde üretim güçlüğü ile karşılaşmaktadır. Bu çalışmada in vitro doku kültürü teknikleri kullanılarak Garrigues ve Yaltsinki çeşitlerinin çoğaltılması üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Murashige ve Skoog-MS (1962) ortamının kullanıldığı çalışmada sürgün ucu, nod ve embriyolar farklı sitokinin (Benzylaminopurine-BAP ve Kinetin-K) ve oksin (Naphthalene acetic acide-NAA, Indole 3-acetic acide-IAA) kombinasyon ve konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. Embriyo kültürlerinde çeşitler arasında herhangi bir farklılık olmaksızın hormon içermeyen MS bazal ortamı en iyi kök gelişimini sağlarken, Yaltsinki çeşidinde 0.5 mg/lt IAA gövde gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. Kültüre alınan sürgün uçlarında kallus gelişimi meydana gelmiş ve her iki çeşitte de 4.0 mg/lt BAP kolay kırılabilir ve hızlı gelişen kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Bu kalluslarda somatik embriyo gözlenmemiştir. Kültüre alınan nodal eksplantlardan bitki gelişimi en iyi oranda 2.0 BAP mg/lt ve 0.5 IAA mg/lt hormon kombinasyonunu içeren MS ortamı üzerinde meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlar, nodal eksplantların Garrigues ve Yaltsinki çeşitlerinde direk somatik embriyogenez ve bitki regenerasyonunda kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Badem, bitki doku kültürü, klonal çoğaltım

ABSTRACT

CLONAL PROPAGATION OF *Prunus amygdalus* L. BY IN VITRO TISSUE CULTURE TECHNIQUES

YAPAR, Narin Haki

M.Sc. in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Canan CAN

Sep 2004, 40 pages

Almond (*Prunus amygdalus* L.) is cultured in the Gaziantep province is naturally spreads in the area. Recently some hybrid varieties are brought to region and adaptation studies have already been started. The plant is easily propagated through grafting in vivo; however the production is depended on the climatic factors restricting the production. In this study in vitro propagation of Garrigues and Yaltinski varieties of almond was investigated.

Murashige and Skoog-MS (1962) supplemented with different concentrations and combinations of cytokinins (Benzylaminopurine-BAP and Kinetin-K) and auxins (Naphthalene acetic acide-NAA, Indole 3- acetic acide-IAA) was used for shoot tip, nodal segments and embryo cultures. The best root formation in embriyo cultures was obtained in media without growth regulators, and MS media supplemented with 0.5 mg/l of IAA resulted good stem development in Yaltsinki. Calli developed from cultured shoot tips and MS+4 mg/l BAP resulted fast growing-fragile callus growth. However no somatic embriyo developed from such calli. Cultured nodal explants were best inducted with MS supplemented with 2.0 BAP mg/l and 0.5 IAA mg/l for plant regeneration. The results obtained suggest that nodal explants can be used for direct embryogenesis in Garriguez and Yaltinski.

Keywords: *Prunus amygdalus*, plant tissue culture, clonal propagation

İÇİNDEKİLER

ONAYLAR

ÖZ

i

ABSTRACT

ii

ŞEKİLLER DİZİNİ

v

SİMGELER ve KISALTMALAR

vi

TABLolar DİZİNİ

vii

TEŞEKKÜR

viii

1. GİRİŞ

1

2. KAYNAK ÖZETLERİ

5

3. MATERYAL VE YÖNTEM

14

3.1. Materyal

14

3.1.1. Bitki materyali

14

3.1.2. Kimyasallar

14

3.1.2.1. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasalla

14

3.1.2.2. Kültür ortamına sonradan ilave edilen hormonlar

14

3.1.3. Kullanılan cihazlar

15

3.2. Yöntem

15

3.2.1. Kültür ortamının hazırlanması

15

3.2.1.1. MS ortamının hazırlanması

15

3.2.1.2. Hormonların hazırlanması

15

3.2.1.3. Sterilizasyon

15

3.2.2. Embriyo kültürü çalışmaları

16

3.2.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

16

3.2.3. Sürgün ucu kültürü çalışmaları

16

3.2.3.1. Sürgün ucu sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

16

3.2.4. Nod kültürü çalışmaları

17

3.2.4.1. Nodların sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

17

3.2.5. İstatistik analizleri

17

4. BULGULAR

18

4.1. Embriyo Kültürü Çalışmaları

18

4.1.1. Embriyo Kùltürü I. Deneme (Yaltinski)	18
4.1.2. Embriyo Kùltürü I. Deneme (Garrigues)	20
4.1.3. Embriyo Kùltürü II. Deneme (Yaltinski)	23
4.1.4. Embriyo Kùltürü II. Deneme (Garrigues)	25
4.2. Sürgün Ucu Kùltürü Çalışmaları	27
4.3. Nod Kùltürü Çalışmaları	29
5. TARTIşMA VE SONUÇLAR	31
6. KAYNAKLAR	34
EKLER	38
BU TEZ ÇALIşMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: <i>Prunus amygdalus</i> L.'nin genel görünümü	4
Şekil 1.2: <i>Prunus amygdalus</i> L.'nin çiçeklerini görünümü	4
Şekil 4.1. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Yaltinski çeşidinde embriyo kültürü	19
Şekil 4.2. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Yaltinski çeşidinde embriyo kültürlerinden kök gelişimi	20
Şekil 4.3. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Garrigues çeşidinde embriyo kültürü	21
Şekil 4.4. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Garrigues çeşidinde embriyo kültüründen gelişen kökler	22
Şekil 4.5. <i>Prunus amygdalus</i> cv Garrigues'de embriyoların 4.0 mg/l Kin içeren MS ortamında kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde gelişimi	27
Şekil 4.6. <i>Prunus amygdalus</i> cv Garrigues'de sürgün ucu kültürü ile meydana gelen kallus gelişimi	29
Şekil 4.7. <i>Prunus amygdalus</i> cv Yaltinski'de nod kültürü	30

SİMGELER ve KISALTMALAR

IAA	İndol-3-asetik asit
NAA	Naptalen asetik asit
IBA	İndol butirik asit
BAP	6-Benzilaminopurine
2,4-D	2,4 Dicholophenoxy acetic acid
MS	Murashige ve Skoog
WPM	Lyod ve Mc Cown (1980)
WS	Wolter ve Skoog
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
m ²	Milimetrekare
dH ₂ O	Deiyonize su
M	Molar
N	Normal
gr	Gram
mg	Miligram
l	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
atm.	Atmosfer basınç
ppm.	Milyonda bir değer
r.p.m.	Dakikadaki devir sayısı
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
°C	Santigrat Derece
sp.	Cinsine ait tür

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1: Dünya badem üretimi (DİE, 2001)	3
Tablo 4.1: <i>Prunus amygdalus</i> cv Yaltinski'de embriyoların farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonunda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde uzunlukları	18
Tablo 4.2. <i>Prunus amygdalus</i> cv Garrigues'de embriyoların farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonunda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde uzunlukları	21
Tablo 4.3. <i>Prunus amygdalus</i> 'un cv Yaltinski'de embriyoların kültüre alınması ile meydana gelen kök ve uzunlukları	24
Tablo 4.4. <i>Prunus amygdalus</i> cv Garrigues'de embriyoların farklı kombinasyon ve konsantrasyonda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve uzunlukları	26
Tablo 4.5. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Yaltinski ve Garrigues çeşitlerinde sürgün uçlarının kültüre alınması ile meydana gelen kallus gelişimleri	28
Tablo 4.6. <i>Prunus amygdalus</i> 'un Yaltinski çeşidinde nodların kültüre alınması ile meydana gelen sürgün uzunlukları	30

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bۆlm imknlarını sonuna kadar seferber ederek maddi ve manevi desteklerini gۆrdğm Biyoloji Bۆlm Başkanım Sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a,

Tez çalışmalarımın her aşamasında bizzat yanımda bulunan ve bütün bilgisini ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Canan CAN'a,

Tez çalışmam sırasında ۆzellikle laboratuvar aşamalarında yardımını esirgemeyen Araş. Gۆr. Türkan AYTEKİN'e,

Tezin düzenlenmesinde yardımlarını gۆrdğm Araş. Gۆr. Fatih YAYLA'ya,

Tezim sırasında desteklerini gۆrdğm Biyoloji Bۆlm hocalarına ve çalışma ekibine,

Yüksek lisansa çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olarak desteklerini esirgemeyen eşim Berrin, oğullarım Bedri ve Fatih Emre'ye,

TEŞEKKÜR EDERİM.

1. GİRİŞ

Badem, erik ve şeftali gibi sert çekirdekli meyve türleri tohumla üretiminin yanı sıra aşılama, daldırma, çeliklerin köklendirilmesi gibi yöntemler kullanılarak üretilmektedir. Ancak bu yöntemlerle üretim her zaman seri ve ekonomik bir çoğaltım için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle günümüzde yapılan çalışmalar meyve türlerinin üretiminde alternatif bir yöntem olarak doku kültürü üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu amaçla farklı türler için farklı doku kültürü yöntemleri denenmiş ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ülkemiz meyveciliğinin geliştirilmesinde büyük öneme sahip olan, ismine doğru sağlıklı ve istenilen özelliklere sahip fidan yetiştirilmesinin sağlanması amacıyla doku kültürü çalışmalarına hız verilmektedir.

Bitki doku kültürü yöntemleri son yıllarda geniş uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntem genel olarak aseptik koşullarda yapay ortamlar üzerinde bitki doku, organ, hücre ve protoplastlarının kültüre alınmasını içerir. Bu amaçla, bitki hücrelerinin totipotens özelliklerinden yararlanır. Bitki doku kültürü günümüzde tarım, orman ve meyve türlerinin patojenlerden arındırılmasında, klonal çoğaltılmasında ve daha önemlisi bitki genetik mühendisliğinde geniş uygulama alanı bulan yöntemlerden birisi olmuştur (Pierik, 1997; Babaoğlu, 2001). Doku kültürü yöntemleri, bitkilerin vejetatif olarak çoğaltılmasına alternatif olarak birçok tekniklerin kullanılmasını sağlayacak avantajlar sunmaktadır. En önemlisi, aseptik koşullarda klonal çoğaltmayı olası kılarak, kısa bir sürede, küçük bir alanda bir bitki doku parçasından, çok fazla oranda ismine doğru bitkinin elde edilebilmesidir (Pierik, 1997; Babaoğlu, 2001). İn vitro bitki doku ve hücre kültürü tekniklerindeki gelişmeler hastalık ve ekstrem koşullara dayanıklı bireyler geliştirilmesinde yepyeni olanaklar sağlamıştır (Grosser, 1985). Çok sayıda bitki hücresinin selektif agent olarak kullanılan stres faktörleri ile (hastalık etmeni mikroorganizmaların toksinleri, herbisitler, düşük sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları vb.) muamelesi sonucu bitki dokusunu oluşturan hücreler arasında var olan veya in vitro koşullarında uygulanan stres faktörlerinin etkisi ile ortaya çıkan mutant doku ve hücre hatlarının seçimi mümkün

olabilmektedir. Böylece stres faktörlerine tolerant veya dayanıklı bireylerin seçimi tamamen laboratuvar koşullarında daha güvenilir ve daha kısa zamanda gerçekleştirilmektedir (Wenzel vd., 1984). Ayrıca yine son yıllarda bitki protoplast kültürleri ve füzyonu çalışmalarındaki hızlı gelişmeler, eşeyssel melezlemede karşılaşılan güçlükleri aşmada büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Protoplast füzyonu ile aralarında eşeyssel açıdan melezleme sorunu olan bitkilerde, somatik hibridizasyonla hibrit bitkiler elde edilebilmektedir (Dix, 1990). Protoplast kültürlerinin yeni bitkilerin geliştirilmesindeki katkısı, sadece somatik hibridizasyon ile klasik melezlemede karşılaşılan güçlükleri çözüme getirmesi olmayıp, bunlardan daha ilginç olanı, rekombinant-DNA teknolojisi ve organel transferinde de kullanılmasıdır. Bir bitkiden izole edilen DNA, fiziksel ve kimyasal yöntemlere bir diğer bitkiden elde edilen protoplastlara aktarılabilen ve somaklonal varyant bitkiler elde edilebilmektedir (De le Pena vd., 1987; Rhodes vd., 1988).

İn vitro doku kültürü teknolojisinin bitki üretimi ve ıslahında kullanılabilirliği kültüre alınan hücre veya dokulardan yüksek oranda embriyo gelişimine bağlıdır. Ayrıca doku kültürlerinde embriyo gelişimini etkileyen faktörlerin (ortamın bileşimi, ışık ve ısı dereceleri, kullanılacak doku tipi, ortamın hormon kombinasyonu) kesin olarak belirlenmesi gereklidir (Murashige ve Skoog, 1962; Thorpe vd., 1991). Ağaç bitkilerinin doku kültürü ile üretimi direk somatik embriyogenesis veya kallus aracılığı ile embriyogenesis (dolaylı yöntem) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Thorpe vd., 1991). Bununla birlikte somaklonal varyasyonun artmasına neden olduğu için klonal çoğaltmada dolaylı yöntem tercih edilmemektedir (Marcotrigiano ve Jagannatham, 1988). Bu nedenle çok sayıda bitki üretimi amacı ile direk olarak morfogenez oluşumunun meydana gelmesi istenmektedir.

Prunus amygdalus'un anavatanı Orta ve Batı Asya'dır. Buradan Çin, Hindistan, İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine yayılmıştır. Ağaçları dikenli çalı şeklinde, meyveleri sert ve kalın kabukludur. Dünyada badem üretimi 2001 DİE Tarım İstatistikleri Özetlerine göre dağılımı aşağıdaki Tablo 1.1'de verilmiştir.

Prunus cinsine ait türlerin klasik yöntemler kullanılarak üretimi, tüm meyve ağaçlarında da olduğu gibi mevsime bağımlılık göstermekte ve tohumla üretiminde standardizasyonun sağlanamamaktadır. Bu çalışmada *P. amygdalus* (badem)'in

Yaltinski ve Garrigues çeşitlerinin in vitro bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltılmasında bazı oksin ve sitokinlerin etkisi araştırılmıştır.

Tablo 1.1: Dünya badem üretimi (DİE, 2001) (ton)

Ülkeler	Yıllar				
	1997	1998	1999	2000	2001
U.S.A	549,000	393,000	377,840	318.880	376,480
İspanya	388,851	220,439	279,100	223,300	257.000
İtalya	104,494	87,998	103,100	104.755	112.812
İran	74,396	111,992	95,900	89.637	97.144
Fas	52,700	52,700	81,304	65.044	81.820
Tunus	51,000	55,000	58,000	62.000	30.000
Suriye	26.341	67,150	57,697	62.288	49.487
Yunanistan	56,046	40,344	46,319	47.184	55.267
Türkiye	33,000	36,000	43,000	47.000	42.000
Pakistan	49.000	49,100	50,000	32,336	33.236
Lübnan	31,254	39,000	31,000	32.000	33.000
Libya	29.500	30,000	30,500	30.500	31.000
Cezayir	19,396	21,641	25,602	26.483	26,000
Çin	23,000	20,000	22,500	17.000	20.000
Avustralya	11,786	13,760	17,942	17.420	18.000
Dünya	1,569.890	1,304,114	1,393,312	1.246.239	1,330,321

İç İthalat (Ton)	Yıllar					
	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Türkiye	157	587	185	145	1279	503

Kabuklu İthalat (Ton)	Yıllar					
	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Türkiye	187	945	951	1560	1621	2142

İç İhracat (Ton)	Yıllar					
	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Türkiye	202	299	177	95	46	69

Kabuklu İhracat	Year					
	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Türkiye	233	267	46	198	261	453

Tablo 1.1.'de görüldüğü üzere Türkiye badem üretimi bakımından alt sıralarda yer almaktadır.



Şekil 1.1: *Prunus amygdalus* L.'nin genel görünümü



Şekil 1.2: *Prunus amygdalus* L.'nin çiçeklerinin görünümü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki hücrelerinin izolasyonu ve kültüre alınabileceği ilk olarak, Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt tarafından 1902 yılında ileri sürülmüş, fakat araştırmacı hücreleri kültüre alamamıştır. Haberlandt'ın gerçekleştiremediği, "bitki hücrelerini sürekli kültüre alma" Haberlandt'ın öğrencilerinden, Kotte ve Robbins tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiştir. 1934 yılında White tarafından, domates kök ucu parçaları kültüre alınmış, böylece bitki doku ve hücrelerinin kültüre alınabileceği kanıtlanmıştır. Nobecourt (1937) ve Gautheret (1937), birbirinden habersiz olarak havuçta, White (1939) tütünde kallus kültürlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu safhadan sonra, daha çok yapay ortamların gerçekleştirilmesi üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmüş, Skoog vd. (1955)'de Kinetin'i bulmuşlar, Murashige ve Skoog vd. (1962) günümüzde en fazla kullanılan doku kültürü ortamını geliştirmişlerdir. En büyük aşama, Muir vd. (1954) tarafından hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesi ile olmuştur. Hücrenin totipotens özelliğinden faydalanarak, bir hücreden yeni bitki elde etme amacıyla ilk aşamalar, Bergmann (1960) tarafından hücrelerin katı ortam üzerine yayılarak, tek hücreden kallus elde etme çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Önemli diğer bir aşama genetik çalışmalar için haploit homozigot hücrelerin elde edilmesidir. Bu konuda ilk çalışmalar, Datura çiçek tozlarından haploit embrioidler oluşabileceğinin gösterilmesiyle başlamıştır.

Günümüzde bu konularda çok fazla çalışma yapılmakta ve doku kültürü teknikleri biyoteknolojide geniş kullanım olanakları bulmaktadır.

İn vitro kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte uygun olmayan konsantrasyonlarda ortama ilave

edildiklerinde genellikle hiçbir etki ortaya çıkmaz. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir. İndol asetik asit, zeatin, zeatin ribozid, GA, absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanlar oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir (Babaoğlu vd., 2001).

Oksinler; fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA (indol-3-asetik asit)'tir. Sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve Piklorom sayılabilir (Babaoğlu vd., 2001).

En çok kullanılan sitokininler adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de BAP (6-Benzylaminopurine) en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (redifferentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup (Smith, 1992), antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler.

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovul kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırırlar (Babaoğlu vd., 2001).

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. Absisik asitin doku kültürlerinde rolü henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte halen somatik embriyoların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır.

Işık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kültür kaplarındaki oksijen/karbondioksit ve diğer gazların yoğunluğu da başarıda etkili olmaktadır. Bitki türüne bağlı olmakla beraber en

yüksek oranda embriyo gelişimi 24 –26⁰ C'de gerçekleşmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

İn vitro çalışmalarda kullanılan başlangıç bitki parçası eksplant olarak adlandırılmaktadır. İn vitro çalışmaların başarısında eksplant seçimi son derece önemlidir (Tisserat, 1991). Yüksek oranda başarı elde etmek için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen, sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir. Olgun ve yüksek oranda organize olmuş dokuların embriyogenesis kapasiteleri son derece düşüktür. Eksplant bitkinin en uygun gelişme fizyolojisinde olduğu dönemde alınırsa bitkinin birçok parçası somatikembriyogenesis için kullanılabilir. Ancak, genç doku ve organlar genellikle yaşlı doku ve organlardan daha başarılı olmaktadır. Eksplant alınacak bitkilerin yetiştirme şartları da embriyogenesisin başarısında önemli rol oynamaktadır. Işık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olmaktadır (Warren, 1991). Genellikle sera şartlarında gelişen bitkiler tarlada yetişen bitkilerden daha iyi sonuç vermektedir. Ayrıca, tüm gelişme şartları optimum düzeyde olduğundan dolayı, in vitro da gelişen bitkilerden alınan eksplantlardan da yüksek oranda başarı sağlanabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Genel olarak, otsu bitkiler ağaç ve çalılara göre daha kolay rejenerasyon sağlamaktadır (Pierik, 1987). Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlemlendiği gibi, aynı tür içindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır (Parrott vd., 1993).

Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre, polen vb.) yapay besin ortamlarında yeni bitkilerin üretimi doku kültürü ile mümkün olmaktadır. Bitkilerin in vitro doku kültürü ile üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, anter, hücre, protoplast kültürü vb) adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde; tek boğum (nod), aksiller dallanma, adventif sürgün, hücre, protoplastlardan bitki regenerasyonu kullanılır. Mikroçoğaltım da denilen bu yöntemle; zor üretilen türlerin daha kolay üretilmesi, seçilen belirli üstün genotiplerin hızlı üretilmesi, üretimde daha az anaç kullanılması ve alışlagelmiş yöntemlerden daha kısa sürede üretilmesi sağlanır (Babaoğlu vd., 2001).

Emriyo kültürleri; sekonder metabolit üretimi amacıyla farklılaşmış ve organize olmuş kültür ile metabolit üretimi yapılan kültürlerdir. Bitkilerin canlıların temel besin kaynağı olarak karbonhidrat, protein ve yağları üretmesi primer metabolit olarak; kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı kimyasallarda (odun, selüloz, zank ve lastik gibi) sekonder metabolit olarak isimlendirilir. Şayet bir metabolit embriyoda üretiliyor veya birikiyorsa bu metabolitin üretimi embriyo kültürleri ile gerçekleşebilir. Bu kültürler ya doğrudan somatik embriyogenezle yani kaynak bitki dokularından (zigotik embriyo, kotiledon, yaprak ve hatta gövde dokuları) aseksüel embriyoların oluşturulmasıyla ya da dolaylı somatik embriyogenesisle yani kallus veya hücre süspansiyon kültürlerinde farklılaşma teşvik edilerek embriyoların oluşturulmasıyla elde edilir (Babaoğlu vd., 2001).

Meristem kültürü hastaliksız bitkiler elde etmek üzere geliştirilmiş in vitro kültür tekniklerinden biridir. Meristem kültürü önce vegetatif olarak çoğaltılan bitkilerin hızlı klonal çoğaltımı virüssüz materyal elde etme ve hem vegetatif hem de tohumla üretilen bitkilerin germplazmalarının muhafazası gibi alanlarda kullanılmış daha sonra bitki ıslahında gen transferileri ile genetik transformasyonları gerçekleştirmede kullanılmaya başlanmıştır. (Nehra ve Kartha,1994).

Meristem kültürü alanında ilk girişim *Stellaria media* sürgün ucunun kültüre alması ile olmuştur. Daha sonra *Asparagus officinalis*'in 5 mm uzunluğundaki gövde uçlarının kültüre alınması sağlanmıştır. Esas olarak meristem kültürünün başlangıcı *Tropaeolum majus*'dan başarılı bir meristem ucu kültürü ve sonuçta köklü bitkilerin elde edilmesi ile olmuştur. Daha sonra meristem ucu kültürlerinin virüsten arı bitkileri üretmedeki potansiyeli büyük ilgi görmüştür, 1952 yılında Dahlia'da ve 1995 yılında da 6 patates çeşidinde virüsten arı bitkiler elde edilmiştir (Dodds veRoberts, 1986; Nehra ve Kartha, 1994).

Prunus spp, Rosales ordosu içerisindeki Rosaceae familyasına bağlıdır ve 40 kadar türü vardır (Dokuzoğuz, Gülcan, 1979). Akbadem, Hacı Ali Bey ve Gülcan yerli çeşitler, Garrigues, Yaltinski, Ferragnes, Cristomorto, Drake, Ferraduel, Flots ve Texas ise yabancı çeşitler olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan Garrigues ve Yaltinski çeşitleri bölgeye yeni giren çeşitlerdir. Yaltinski: kendisiyle tozlaşmayan kuvvetli ağaçlar oluşturan bir çeşittir ve tozlayıcıları Ferragnes ve

Flots'dur. Kabuklu badem 2.0 g ağırlığında, 31mm uzunluğunda, eni 19mm ve kalınlığı 14 mm'dir. Verimliliği orta, derimi erkendir (Küden 2000). Garrigues: güçlü ağaç gelişimi, üretime hızlı geçişi yüksek verim gibi nedenlerle üstün bir çeşittir. Tad olarak iyi olmasına rağmen kuraklığa duyarlıdır. Ancak sulu ortamlarda yetiştirilirse yüksek verim elde edilir (Traveria, 2000). Anavatanı Orta Asya olan *Prunus spp.*, özellikle Amerika, İspanya, İtalya, İran, Fas Tunus, Suriye ve Türkiye'de yetiştirilmektedir. Derin kök sistemine sahip (kazık köklü) olup sonbaharda yapraklarını döken çalı veya 10 m ye kadar boylanabilen ağaçlar oluştururlar. Ortalama ömrü 50 yıl olup 100 yaşına kadar yaşayan ağaçlara da rastlamak mümkündür. Kuzey yarım kürede 30–44, güney yarı kürede ise 20–40 enlem dereceleri arasında -20°C - $+50^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında yetişir. Orta derecede derin, drenajı iyi, milli ve normal kireç ihtiva eden topraklarda iyi gelişir (Dokuzoğuz ve Gülcan, 1979).

Badem daha ilkbaharda taze çağla devresinden hasat edilinceye kadar herhangi zamanda yenebilen bir meyvedir. Bunun yanı sıra çerez olarak (çağla badem, taze iç badem, kavrulmuş tuzlu veya tuzsuz badem), şekerleme, çikolata ve pasta endüstrisinde (badem şekeri, draje, badem ezmesi, çeşitli pastalar ve çikolatalar), badem yağı, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanım alanı olan bir meyvedir. Bademin Dünyadaki üretimi 2001 verilerine göre çoktan aza doğru ilk 10 ülke; Amerika (376000 ton), İspanya, İtalya, İran, Fas, Tunus, Suriye, Yunanistan, Türkiye (42000 ton) ve Pakistan şeklinde sıralanmaktadır. Türkiye bu sıralamada dokuzuncu olarak bulunmakta olup yeterince üretim yapamamaktadır. Bunun sebebinin ise ülkemizde bademin tohumla üretilmesi ve bademde standardizasyonun sağlanamamasından kaynaklandığını söyleyebiliriz (Dokuzoğuz ve Gülcan, 1979).

İn vitro da badem üretimi üzerine yapılan bir araştırmada sürgün ucu eksplantı kullanılarak IBA (0.1 veya 0.5 mg/lt) ve BAP'ın (0.5, 1.2 veya 3 mg/lt) etkileri araştırılmıştır. Başlangıç çalışmalarında hormonsuz veya düşük IBA (0.1 mg/lt) konsantrasyonlarında, sürgün gelişmesi gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda yeni sürgün üretimi ve gelişimi üzerine en etkili konsantrasyonların 0.1 mg/lt IBA ve 1 mg/lt BAP birleşimi olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda BAP'ın sürgün gelişimi için gerekli olduğuna, fakat yüksek oranlarda kullanımının (2 veya 3 mg/lt),

sonradan sürgünlerin yaşam kabiliyetini azaltan vitrifikasyon ve kallus oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Gürel ve Gülşen, 1998).

Bir yaşındaki Plus-ultra ve Nonpareil fidanlık bitkilerinin kullanıldığı bir çalışmada bu bitkilerinden alınan sürgün ucu ve nod (1-1.5 cm uzunluğundaki) eksplantları, steril edildikten sonra MS bazal ve 0.1mg/lt IBA+ 0.5mg/lt BAP hormonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Dört hafta sonunda en iyi sonuç IBA+BA ilaveli MS ortamından sağlanmıştır. Yeni oluşan sürgünler, 1- 2 mg/lt BA ve adenin sülfat içeren MS ortamına aktarılmıştır. 2mg/lt BAP içeren ortamda en yüksek gelişme sağlanmıştır. Sürgünler 1 mg/lt IBA-NAA hormon kombinasyonlarını içeren Bourgan ve Nitsch ortamlarında köklendirilmiştir. Sürgünlerden sayı ve uzunluk bakımından en iyi köklenme karanlıkta IBA+NAA ilaveli ortamda sağlanmıştır (Saeed, 1998).

Başka bir araştırmada in vitro'da bademin vejetatif kısımlarından, M55 ve Ferragnes, kayısı Bergeron, şeftali (*Prunus persica* l cv), Babygold, erik anaç Penta ve *P. institia* x *P. domestica* cv Julior'dan adventif sürgün geliştirilmiştir. In vitro'da gelişen sürgünlerden kesilen kısımlar 8.8 µM BA, 1.0 µM NAA ve 250 mg/lt cefotaximin içeren LP ortamında 30 gün boyunca karanlıkta kültüre alınmıştır. Daha sonra 1.4 µM gibberellik asit içeren ortamlara transfer edilerek ışıklı ortamlarda aylarca alt kültürleri yapılmıştır. Bütün genotiplerdeki eksplantların % 5-10'unda kararmalar olmuştur. 8.8 µM BA içeren M55 ortamında eksplantların büyük bir kısmından sonuçlar elde edilmiştir. Yenileme çalışmaları için uç meristemler ve yaprak primordiaları kullanılmıştır (Lauri vd.,2001).

İki badem genotipine (Supernova ve Sel M51) ait bitkiciklerin materyal olarak kullanıldığı bir araştırmada bu bitkicikler 10µM IAA veya 10µM IBA içeren Bourgin ve Nitsch ortamına yerleştirilmiş ve 12 günlük karanlık ortamda bekletildikten sonra kök gelişimi gözlenmiştir. En yüksek köklenme yüzdesi (%95) IAA içeren ışıklı ortamlardan elde edilmiştir. (Caboni ve Damiano, 1994)

Diğer bir çalışmada dört anacın [yabani şeftali, yabani kayısı, Behmi (şeftalixbadem) ve acı badem], beş farklı klonal erik anaçı (Myrobalan B, Brompton, Pershore, Damas C ve St. Julien A), erik (Santa Rosa), kayısı (Newcastle), şeftali (July Elberta), badem (Nonpareil) ve badem x şeftali hibridi (GF 677) eksplantları

alınmıştır. Eksplantlar kum ve kısmi gölge korumalı polietilen torbalarına yerleştirilmeden önce 10 s 2000, 4000 veya 6000 p.p.m'de IBA solüsyonuna ve arkasından % 0.3'lük fungusit solüsyonuna daldırılmıştır. Köklenme parametreleri, ekimden sonraki 8. ayda ölçülmüştür. Ekim zamanında sonuç elde edilmeyen 12'lik örnek grubu, biyokimyasal analizlere maruz bırakılmıştır. En yüksek köklenme % 46.76 olmuş, ilk köklerin ortalama uzunluğu 10.96cm ve eksplantların yüksekliği 62.69 cm olarak kaydedilmiştir. En iyi sonuç Santa Rosa ve Myrobalan B'den elde edilmiştir. IBA uygulananlardan 2000 p. p. m IBA en etkili olarak tespit edilmiştir. Newcastle, Nonpareil, yabani kayısı, Behmi ve acı badem eksplantları, hiçbir uygulamada kök vermemiştir (Rana ve Chadha, 1989).

Acı badem (*Prunus dulcis*) mikrofilizlerinin in vitro da korunmasına etki eden bazı faktörler çalışılmış, artan sakkaroz (0.09'dan 0.35 M'e), sorbitol, mannitol (0.1'den 0.4 M'e) veya absisik asidin (ABA; 0.0'dan 11.4 M'e), büyümeyi önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Kültürler oda sıcaklığında muhafaza edildiğinde alt kültürlerin süresi 4 aya uzamıştır. Kültürler, ozmotik etki veya ABA'nın yüksek konsantrasyonlarında geliştirildikten sonra yeni ortama transfer edildiğinde büyüme yavaşlamıştır. Sürgünler, 1.8 µM, 6-BAP ve 0.5 µM NAA içeren ortamda 2 defa alt kültüre alındıktan sonra gelişmeye başlamıştır. Mikrosürgünler, 11.4 µM IAA içeren ortamda köklenmiş ve köklenen sürgünlerin %90'ı in vivo ortama adapte olmuştur. (Shipli vd.,1999)

P. dulcis tohumlarından gelişen sürgün eksplantları, Sel. M51 ve şeftali anacı 30 g/lt sakkaroz, 1.4 µM IAA, 2.2 µM BA, 2.5 g/lt agar ve 8 g/lt pektin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Köklendirme 30 g/lt sakroz ve 7 g/lt agar ve 5 µM IAA içeren MS ortamında sağlanmıştır. İlk deneyde 2.89–5.87 µM GA₃ otoklav edildikten sonra ortama ilave edilmiş, kontrol grubuna GA₃ ilave edilmemiş ve 2, 4 ya da 6 defa alt kültüre alınmıştır. İkinci deneyde 2–2.5 cm uzunluğundaki eksplantlar 2–3 gün GA₃ bulunmayan köklendirme ortamına yerleştirilmiş, daha sonra 0, 0.1, 1.0 ya da 10 µM GA₃ içeren aynı ortama transfer edilmiştir. Ortama GA₃ ilave edildiği zaman, 6. alt kültüre 2.89 µM ilave edildiğinde köklenme oranında artış, 2. alt kültürde köklenmeyi olumsuz etkilediği, 4. alt kültürde ise köklenmeye etki etmediği görülmüştür. Köklendirme ortamına GA₃ eklendiği zaman eksplantların köklenme oranında azalma olmuş ve peroksidaz aktivitesi yükselmiştir;

GA₃ yüksek konsantrasyonda eklendiğinde köklenmeyi engellemiştir. (Caboni vd.,1994)

Başka bir araştırmada eksplantlar 2 yıl boyunca in vitro da kültüre alınan elma anaçları (M26 ve cost M9), şeftali fideleri (7010200 ve P102), tüysüz şeftali (Mayfair ve Weinberger) ve bademden (Fascionella ve MN51) alınmıştır. İlk köklendirme boyunca çoğalma oranları, türlerine göre çeşitlilik göstermiştir. En iyi köklenmeyi IBA içeren ortamda M26 göstermiştir. Karanlıkta kültüre alınan şeftalilerden az sayıda fakat iyi kalitede kökler elde edilmiştir. İki şeftali bitkisi arasındaki kökleme yüzdesinde BA ilaveli ortamlarda en yüksek çeşitlilik oluşmuş, homojen sonuçlar ise Kinetin bulunan ortamlardan alınmıştır. Badem çeşitlerinden Fascionello ışısız ortamda sararmıştır. Karanlıkta MN51, Fascionello'dan daha fazla kök geliştirmiştir. Cost M9'da phloroglucinol ile köklenme azalmış, alt kültür sayısı ve köklenme yüzdeleri arasında önemli derecede pozitif ilişki tespit edilmiştir. Esteraz ve malat dehidrojenez izoenzim profillerinde genotip ve dokunun kökenine bağlı polimorfizm görülmüştür. İki badem genotipi spesifik peroksidaz izoenzim profilleri göstermiş, MN51 farklı köklenme safhaları ve solma profilleri göstermiştir (Damian vd.,1992)

M51 çeşidi bademden alınan eksplantlar IAA ya da IBA (0-10 µM) içeren Bougin ve Nitsch ortamında 20 gün boyunca 12 günü karanlık ya da aydınlık olmak üzere farklı koşullarda kültüre alınmıştır. En yüksek kökleme yüzdesi (%95) ışıkta IAA içeren ortamda sağlanmıştır. En yüksek kök sayısı eksplant başına 4,5 kök olarak tespit edilmiştir. Peroksidaz aktivitesini, IAA teşvik etmiş, IAA'sız ortamlarda ise peroksidaz aktivitesi stabil kalmıştır. (Caboni vd ., 1994)

Şeftali anaçlarında kök formasyonu üzerine oksinlerin etkisi araştırılmıştır. Barrier (*Prunus persica* x *P. davidiana*), GF 677 (*P. persica* x *P. amygdalus*) ve Kando (*P. persica* x *P. amygdalus* cv. Sultan) sürgünleri NAA, IBA ve IAA'nın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren ½ Q ortamında köklendirilmiştir.10- 20 mm uzunluğundaki sürgünler köklendirilmeden önce 56 gün boyunca 4 °C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. En iyi köklenme 1.0mg/lt NAA içeren ortamdan elde edilmiştir.0.5mg/lt NAA ise sadece Kando'da daha iyi sonuç vermiştir. Barrier'de %97, GF 677'de %94 ve Kando'da %53 oranında köklenme sağlanmıştır. Köklenen sürgünler 1: 1 oranında hazırlanan torf ve perlit karışımı saksılara aktarılmıştır. Altı

hafta sonunda Barrier'in %78, GF677'nin %84 ve Kando'nun %53 oranında adapte olduğu belirlenmiştir (Franc, 1998).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Araştırmada *Prunus amygdalus*'un Yaltinski ve Garrigues çeşitlerine ait tohum (embriyo), meristem (sürgün ucu) ve nod eksplantları kullanılmış olup bitki materyalleri Fıstık Araştırma Enstitüsü'nün deneme bahçesinden 4 ayrı zamanda (28.11.2002, 06.03.2003, 15.04.2003 ve 27.05.2003) temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Calbiochem, Merck ve Sigma firmalarından satın alınmıştır.

3.1.2.1. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog (1962) (MS) bazal doku kültürü ortamı kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Ek.1 de verilmiştir.

3.1.2.2. Kültür ortamına sonradan ilave edilen hormonlar

a) Sitokininler

6-Benzylaminopurine (BAP, $C_{12}H_{11}N_5$)

6-Furfurylaminopirone (Kinetin, $C_{10}H_9N_5O$)

b) Oksinler

Naphtalene acetic acide (NAA, $C_{12}H_{10}O_2$)

Incolde acetic acide (IAA, $C_{10}H_9NO_2$)

3.1.3. Kullanılan cihazlar

- Sterio Zoom Trinoküler Araştırma Mikroskobu (Soif SQF-D),
- Fuji Film Dijital Fotoğraf Makinesi (S602 Zoom),
- Steril kabin

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür ortamının hazırlanması

3.2.1.1. MS ortamının hazırlanması

Ek.2'de verilen oranlarda A, B, D stok solüsyon grubundaki kimyasallar tartılmış ve dH₂O ile çözülerek üzerleri 100 ml'ye tamamlanmıştır. Stok C'nin hazırlanmasında ise FeSO₄.7H₂O belirtilen oranda tartılmış ve 90 ml dH₂O tamamlanmıştır. Bu çözelti karıştırılarak ısıtılmış ve açık sarı-berrak bir solüsyon haline getirilmiştir. Daha sonra Na₂EDTA-2H₂O (Titriplex) ilave edilmiş, çözeltinin tamamı dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve pH 5.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonlar belirli aralıklar ile kontrol edilmiş ve herhangi bir mikrobiyal bulaşıklık saptandığında yeniden hazırlanmıştır. 1 litre kültür ortamının hazırlanması için stok solüsyonlardan 10'ar ml ve Ek.3.'de verilen kimyasallardan (agar hariç) belirtilen oranlarda alınarak çözelti, saf su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. pH 1M NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.7'ye ayarlanmıştır. Son olarak agar ilave edilmiştir (Can vd., 1992 a; Koç ve Can., 1992).

3.2.1.2. Hormonların hazırlanması

Hormonlar stoklar halinde hazırlanmıştır. Kullanılan oranlarda tartılan hormonlar 1 M NaOH ile çözüldükten sonra saf su ile istenilen miktara tamamlanmıştır. Hormonlar ortama agar ilave edilmeden ve pH ayarlanmadan önce ilave edilmiştir (Can vd., 1992 a).

3.2.1.3. Sterilizasyon

Ortamlar 1 atm. basınçta 121⁰ C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Can vd., 1992 b).

3.2.2. Embriyo kültürü çalışmaları

3.2.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

Sterilant olarak %70'lik etil alkol ve içerisinde 2–3 damla Tween–20 bulunan %5'lik sodyum hipoklorid kullanılmıştır. Yaltinski ve Garrigues tohumları 10 dakika akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonra %70'lik alkol içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra %5'lik sodyumhipoklorid içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Sonra tekrar %70'lik alkolde 1 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir ve içerisinde kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, kültüre alınmak üzere hazır hale getirilmiştir. (Can vd., 1992 a; Koç vd., 1992).

Tohumların embriyoları çıkarılarak farklı oksin ve sitokinin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Hazır bazal MS (sigma) 0.0, 0.5, 1.0 mg/lt. IAA / 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/lt BAP (% 3 sakkaroz) ve stok solüsyonlardan hazırlanan bazal MS ortamlarına, ayrıca 0.0, 2.0, 4.0 mg/lt IAA / 0.0, 2.0, 4.0 mg/lt Kinetin düzeylerinde kombine edilerek kültüre alınmıştır. Kültürler 26 ± 2 °C'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 4–8 hafta sonra yapılmıştır.

3.2.3. Sürgün ucu kültürü çalışmaları

3.2.3.1. Sürgün ucu sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

Sterilant olarak %70'lik etil alkol ve %5'lik sodyumhipoklorid kullanılmıştır. Garrigues ve Yaltinski çeşitlerine ait badem sürgün uçları akan çeşme suyunda 5 dakika yıkanmıştır. Sonra içerisinde Tween–20 bulunan deterjanlı suda 5 dakika yıkandıktan sonra tekrar 5 dakika akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonra 5 dakika %5'lik sodyumhipokloritten ve bir kez steril saf sudan geçirilmiştir. Sonra tekrar 5 dakika %10'luk sodyumhipoklorid, iki kez steril saf sudan geçirilmiş ardından iki dakika %70'lik etil alkolden ve 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Bu işlemlerden sonra içerisinde kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, kültüre alınmak üzere hazır hale getirilmiştir.

Badem sürgün uçları çıkarılarak farklı oksin ve sitokinin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS ortamı üzerine kültüre alınmıştır. Hazır MS (sigma) (%3 Sakkaroz) ve hazır MS kullanılan ortamlara IAA/BAP hormonları (0.0,

0.5, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde kombine edilerek içerisinde 25 ml ortam bulunan petrilere yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Kùltürler 26 ± 2 °C'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 8 hafta sonra yapılmıştır.

3.2.4. Nod kùltürü çalışmaları

3.2.4.1. Nodların sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

Sterilant olarak %70'lik etil alkol ve %5'lik sodyomhipoklorid kullanılmıştır. Yaltinski çeşidine ait nodları akan çeşme suyunda 5 dakika yıkanmıştır. Sonra içerisinde Tween-20 bulunan deterjanlı suda 5 dakika yıkandıktan sonra tekrar 5 dakika akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonra 5 dakika %5'lik sodyumhipokloridden ve bir kez steril saf sudan geçirilmıştir. Sonra tekrar 5 dakika %10'luk sodyumhipoklorid, iki kez steril saf sudan geçirilmış ardından iki dakika %70'lik etil alkolden ve 3 defa steril saf sudan geçirilmıştir. Bu işlemlerden sonra içerisinde kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, kùltüre alınmak üzere hazır hale getirilmıştir.

Yaltinski'ye ait nodlar çıkarılarak farklı oksin ve sitokin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerine kùltüre alınmıştır. Hazır MS (sigma) (%3 Sakkaroz) ve hazır MS kullanılan ortamlara IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde kombine edilerek içerisinde 25 ml ortam bulunan petrilere yerleştirilerek kùltüre alınmıştır. Kùltürler 26 ± 2 °C'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 8 hafta sonra yapılmıştır.

3.2.5. İstatistik analizleri

Sonuçlar, SPSS-11 paket programı kullanılarak Duncan ($P < 0,05$) çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmişlerdir.

4. BULGULAR

4.1. Embriyo Kültürü Çalışmaları

4.1.1. Embriyo Kültürü I. Deneme (Yaltinski)

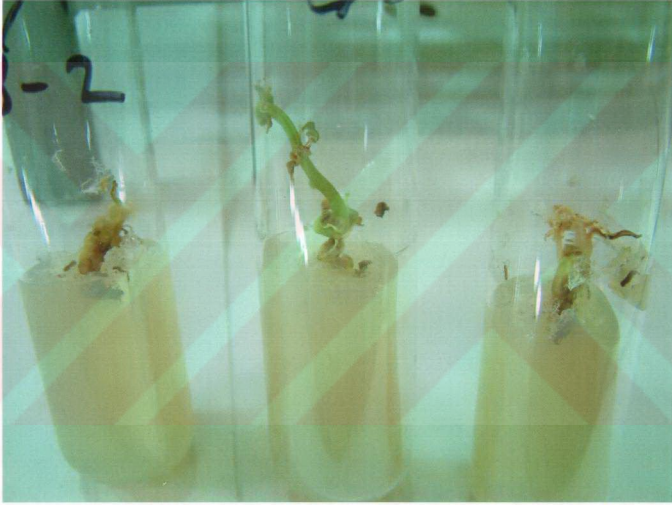
Prunus amygdalus'un Yaltinski çeşidi için embriyo kültürü amacı ile bazal MS ortamına 0.0, 0.5, 1.0 mg/lt IAA / 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/lt BAP düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde Yaltinski'ye ait embriyo eksplantları 28.11.2002 tarihinde kültüre alınmış embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar 4 ve 8 hafta sonra kök ve gövde uzunlukları ölçülerek değerlendirilmiştir (Tablo 4-1).

Tablo 4.1: *Prunus amygdalus* cv Yaltinski'de embriyoların farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonunda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde uzunlukları

Ölçümler					
Hormonlar		Kök uzunluğu (cm)		Gövde uzunluğu (cm)	
BAP (mg/lt)	IAA (mg/lt)	30 gün	60 gün	30 gün	60 gün
0,00	0,00	6,75 c	6,75 b	0,75 ab	1,50 ab
2,00	---	2,25 ab	2,25 a	0,90 bc	1,25 ab
4,00	---	0,45 ab	0,75 a	1,75 c	2,00 ab
---	0,50	1,50 ab	2,16 a	0,86 bc	3,16 b
0,50	0,50	0,50 ab	0,50 a	1,30 bc	1,50 ab
---	1,00	3,30 b	5,92 b	0,77 ab	2,82 ab
1,00	1,00	1,52 ab	2,27 a	1,00 bc	1,57 ab
1,00	1,00	0,85 ab	0,85 a	1,00 bc	1,00 ab

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; kök uzunluğu 4 haftalık inceleme sonucunda 4 farklı grup gelişirken bu grupların 8 haftalık gelişmede 2

farklı gruba düştüğü görülmektedir.4 haftalık inceleme sonucunda: MS bazal ortamında en iyi gelişmenin, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamlarında iyi gelişme, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ortamlarında normal gelişme, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamlarında ise gelişme olmadığı tespit edilmiştir.8 haftalık inceleme sonucunda ise: 0.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP, 0.0 mg/l IAA 2.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ortamlarında gelişmenin az olduğu, 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ortamlarında gelişmenin iyi olduğu ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamında yine gelişmenin görülmeyeceği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Prunus amygdalus*'un Yaltinski çeşidinde embriyo kültürü

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; 4 haftalık inceleme sonucunda gövde uzunluğu gelişimi 4 farklı grup oluşturmuşken, 8 haftalık inceleme sonucunda 3 farklı grup oluşturmuştur.4 haftalık inceleme sonucunda; 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 0.5 mg/l BAP ortamlarında en iyi gelişme, 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ortamlarında iyi gelişme, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamlarında normal gelişme ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamında

ise gelişmenin olmadığı tespit edilmiştir.8 haftalık inceleme sonucunda ise 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında gelişmenin çok daha iyi boyutta olduğu, MS Bazal, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında iyi gelişme olduğu, 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında daha az gelişme olduğu, 0.5 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında ise yine gelişmenin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Prunus amygdalus*'un Yaltinski çeşidinde embriyo kültürlerinden kök gelişimi

4.1.2. Embriyo Kültürü I. Deneme (Garrigues)

Prunus amygdalus'un Garrigues çeşidinin embriyogenesi amacı stoklardan hazırlanan MS (%3 sakkaroz) ortamı ve Agar (8gr/l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde Garrigues'e ait embriyo eksplantları 28.11.2002 tarihinde kültüre alınmış embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar 4 ve 8 haftalık olarak değerlendirilmeye alınmış, kök uzunluğu ve gövde uzunluğu gelişimleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



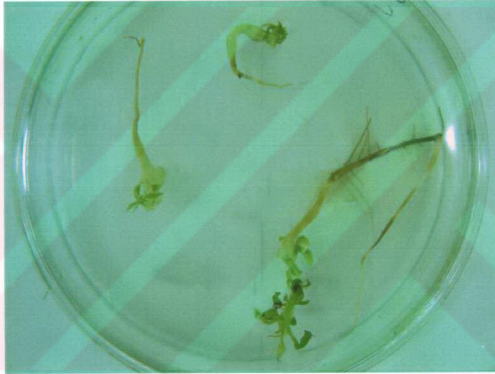
Şekil 4.3. *Prunus amygdalus*'un Garrigues çeşidinde embriyo kültürü

Tablo 4.2. *Prunus amygdalus* cv Garrigues'de embriyoların farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonunda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde uzunlukları

Ölçümler					
Hormonlar		Kök Uzunluğu (cm)		Gövde uzunluğu (cm)	
BAP (mg/l)	IAA (mg/l)	30 gün	60 gün	30 gün	60 gün
0,00	0,00	2,80c	2,80c	2,00b	1,50b
2,00	0,00	1,50b	1,50b	1,00ab	1,50b
4,00	0,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
0,00	0,50	1,00ab	0,00a	0,50a	0,00a
2,00	0,50	1,07ab	0,82ab	1,05ab	1,40b
4,00	0,50	0,75ab	0,00a	1,00ab	0,85ab
0,00	1,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
2,00	1,00	0,80ab	0,80ab	0,60a	0,60ab
4,00	1,00	0,50ab	0,50ab	0,50a	1,30ab

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; kök uzunluğu 4 ve 8 haftalık inceleme sonucunda 4 farklı grup oluşturmuştur.4 haftalık inceleme sonucunda: MS Bazal ortamında gelişmenin en iyi olduğu, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında ise gelişmenin olmadığı, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında gelişmenin normal olduğu tespit edilmiştir.

8 hafta sonunda yapılan inceleme sonucunda ise: MS Bazal, 0.0 mg/l IAA - 2.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ortamlarında gelişmenin az olduğu, 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ortamlarında gelişmenin iyi olduğu ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ortamında yine gelişmenin görülmediği tespit edilmiştir (Şekil 3)



Şekil 4.4. *Prunus amygdalus*'un Garrigues çeşidinde embriyo kültüründen gelişen kökler

8 haftalık inceleme sonucunda ise: 0.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında gelişmenin iyi olduğu, 0.0 mg/l IAA - 2.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP, 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme, 0.5 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında gelişmenin az olduğu, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında gelişmenin görülmediği tespit edilmiştir.

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; 4 haftalık inceleme sonucunda gövde uzunluğu gelişimi 3 farklı grup oluşturmuşken, 8 haftalık inceleme sonucunda yine 3 farklı grup olarak kalmıştır.4 haftalık inceleme sonucunda; MS Bazal ortamında en iyi gelişme olduğu, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında gelişme olmamıştır.0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 4.0 g/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme, 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında az gelişme olmuştur.8 haftalık inceleme sonucunda ise 1.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında en iyi gelişme olduğu, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme, 0.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında az gelişme olmuştur.

4.1.3. Embriyo Kültürü II. Deneme (Yaltinski)

Prunus amygdalus'un Yaltinski çeşidinden Embriyo kültürü amacı ile stoklardan hazırlanan MS (%3 sakkaroz) ortamı ve Agar (8gr/l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/Kinetin hormonları (0.0, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde Yaltinski'ye ait embriyo eksplantları 06.03.2003 tarihinde kültüre alınmış, embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar 4 ve 8 haftalık olarak değerlendirilmeye alınmış, kök uzunluğu ve gövde uzunluğu gelişimleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *Prunus amygdalus*'un cv Yaltinski'de embriyoların kültüre alınması ile meydana gelen kök ve uzunlukları

Ölçümler					
Hormonlar		Kök Uzunluğu (cm)		Gövde uzunluğu (cm)	
IAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	30 gün	60 gün	30 gün	60 gün
0,00	0,00	4,37a	9,00b	1,33b	3,40c
0,00	2,00	15,00b	15,00b	1,00ab	2,50bc
0,00	4,00	1,10a	1,10a	0,93ab	1,86abc
2,00	0,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
2,00	2,00	1,00a	1,00a	0,65ab	2,25abc
2,00	4,00	1,10a	1,10a	1,00ab	1,00ab
4,00	0,00	1,00a	12,50b	1,00ab	1,80abc
4,00	2,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
4,00	4,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; kök uzunluğu 4 haftalık inceleme sonucunda 2 farklı grup gelişirken, bu grupların 8 haftalık inceleme sonucunda grup sayısında farklılık görülmemiştir. 4 haftalık inceleme sonucunda: 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamında en iyi gelişmenin olduğu saptanmışken, 2.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin, 4.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında hiç gelişme olmadığı saptanmıştır. Ancak MS Bazal, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin, 2.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin, 2.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme olduğu tespit edilmiştir. 8 haftalık inceleme sonucunda ise: 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamında gelişmenin dikkat çekici olduğu, MS Bazal ortamında normal bir gelişme, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin, 2.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin ve 2.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında gelişmenin durduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; gövde uzunluğu gelişimi 3 farklı grup oluşturmuşken, 8 haftalık inceleme sonucunda grup sayısının 5'e çıktığı tespit edilmiştir. 4 haftalık inceleme sonucunda: MS Bazal ortamında en iyi

gelişmenin olduğu, 2.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin, 4.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında hiç gelişme olmadığı, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin, 2.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında ise normal gelişme olduğu tespit edilmiştir. 8 haftalık inceleme sonucunda ise: MS Bazal, 0.0 mg/l IAA - 2.0 mg/l Kinetin, 0.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin ve 2.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında daha iyi bir gelişme olduğu, 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında normal bir gelişme olduğu, 2.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamında ise gelişme olmadığı tespit edilmiştir.

4.1.4. Embriyo Kültürü II. Deneme (Garrigues)

Prunus amygdalus'un Garrigues çeşidi için embriyogenesis amacı ile stoklardan hazırlanan MS (%3 sakkaroz) ortamı ve Agar (8gr/l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/Kinetin hormonları (0.0, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde Garrigues'e ait embriyo eksplantları 06.03.2003 tarihinde kültüre alınmış embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.4). Sonuçlar 4 ve 8 haftalık olarak değerlendirilmeye alınmış, kök uzunluğu ve gövde uzunluğu gelişimleri Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

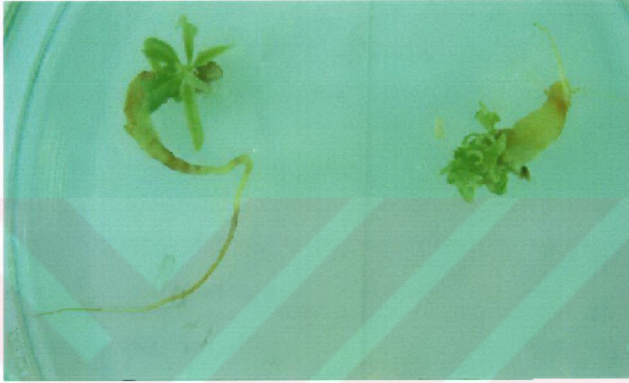
Tablo 4.4. *Prunus amygdalus* cv Garrigues’de embriyoların farklı kombinasyon ve konsantrasyonda kültüre alınması ile meydana gelen kök ve uzunlukları

Ölçümler					
Hormonlar		Kök Uzunluğu (cm)		Gövde uzunluğu (cm)	
IAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	30 gün	60 gün	30 gün	60 gün
0,00	0,00	4,36b	5,33c	0,56a	1,13ab
0,00	2,00	1,35ab	0,92ab	0,67a	0,80a
0,00	4,00	1,85ab	1,85ab	0,75a	1,25ab
2,00	0,00	2,15ab	2,15ab	0,55a	1,55ab
2,00	2,00	0,93ab	1,76ab	0,66a	1,80ab
2,00	4,00	0,73a	1,50ab	0,53a	0,60a
4,00	0,00	1,25ab	3,25b	0,75a	2,85b
4,00	2,00	1,50ab	1,50ab	0,50a	1,70ab
4,00	4,00	0,30a	0,10a	0,16a	0,50a

Tablo 4.4.’de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; kök uzunluğu 4 haftalık inceleme sonucunda 3 farklı grup gelişirken, bu grupların 8 haftalık inceleme sonucunda 4 farklı grup şeklinde gelişme göstermiştir. 4 haftalık inceleme sonucunda: MS Bazal ortamında en iyi gelişmenin olduğu saptanmışken, 2,0 mg/l IAA – 0,0 mg/l Kinetin, 0,0 mg/l IAA – 4,0 mg/l Kinetin ve 4,0 mg/l IAA – 2,0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme olduğu, 4,0 mg/l IAA – 4,0 mg/l Kinetin, 2,0 mg/l IAA – 4,0 mg/l Kinetin ve 2,0 mg/l IAA – 2,0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında daha az gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. 8 haftalık inceleme sonucunda ise: 4,0 mg/l IAA – 0,0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamında gelişmenin en iyi olduğu, 2,0 mg/l IAA - 4,0 mg/l Kinetin, MS Bazal ve 2,0 mg/l IAA – 2,0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında normal gelişme olduğu, 0,0 mg/l IAA – 4,0 mg/l Kinetin, 2,0 mg/l IAA – 0,0 mg/l Kinetin ve 4,0 mg/l IAA – 2,0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında ise gelişmenin olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.4.’de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre; 4 haftalık inceleme sonucunda gövde uzunluğu gelişimi 1 grup oluşturmuşken, 8 haftalık inceleme

sonucunda 3 farklı grup olarak değiştiği tespit edilmiştir.4 haftalık inceleme sonucunda: 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin ve 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında en iyi gelişmenin olduğu, 4.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin ilaveli MS ortamında en zayıf gelişmenin olduğu, diğer hormon ilaveli MS ortamlarında ise gelişmenin normal olduğu tespit edilmiştir.



şekil 4.5. *Prunus amygdalus* cv Garrigues'de embriyoların 4.0 mg/l Kin içeren MS ortamında kültüre alınması ile meydana gelen kök ve gövde gelişimi

8 haftalık inceleme sonucunda ise: 4.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin, 2.0 mg/l IAA - 2.0 mg/l Kinetin ve 2.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamlarında en iyi gelişme olduğu, 2.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l Kinetin hormon ilaveli MS ortamında en zayıf gelişmenin olduğu, diğer hormon ilaveli MS ortamlarında gelişmenin normal olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Sürgün Ucu Kültürü alışmaları

P. amygdalus'un Garrigues ve Yaltinski eşitleri, sürgün ucu kültürü amacı ile hazır MS ortamına IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde 15.04.2003 tarihinde kültüre alınmıştır. Yaklaşık 8 hafta sonunda sonuçlar 2 ayrı çeşit için alınmış ve sonuçlar kallus ağırlığı olarak Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. *Prunus amygdalus*'un Yaltinski ve Garrigues çeşitlerinde sürgün uçlarının kültüre alınması ile meydana gelen kallus gelişimleri

Kallus ağırlıkları (mg) (60 gün)			
IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Garrigues	Yaltinski
0,00	0,00	0,139a	0,191ab
0,00	2,00	0,156a	0,195ab
0,00	4,00	0,171a	0,428b
0,50	0,00	0,130a	0,252ab
0,50	2,00	0,145a	0,000---
0,50	4,00	0,209a	0,385ab
1,00	0,00	0,00---	0,171ab
1,00	2,00	0,210a	0,148a
1,00	4,00	0,192a	0,308ab

Tablo 4.5.'de görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre Garrigues çeşidinde 1 grup, Yaltinski çeşidinde 3 farklı grup gelişme göstermiştir. Sadece kallus gelişimi meydana gelmiştir. Garrigues çeşidi en iyi gelişmeyi 0.5 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında sağlamışken, diğerlerinde normal gelişme sağlamıştır. Ancak, 1.0 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamında gelişme olmamıştır. Yaltinski çeşidinde ise; 0.0 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IAA – 4.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında gelişmenin en iyi olduğu, 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamında gelişmenin olmadığı ve diğer hormon ilaveli ortamlarda gelişmenin normal olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. *Prunus amygdalus* cv Garrigues'de sürgün ucu kültürü ile meydana gelen kallus gelişimi

4.3. Nod Kültürü Çalışmaları

Prunus amygdalus'un Yaltinski çeşidinde nod kültürü amacı ile MS ortamına IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde nod eksplantları kültüre alınmıştır. Yaklaşık 8 hafta sonunda sonuçlar nod uzunluğu olarak Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. *Prunus amygdalus*'un Yaltinski çeşidinde nodların kültüre alınması ile meydana gelen sürgün uzunlukları

Hormonlar		Uzunluk (cm)
IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	
0,00	0,00	0,683ab
0,00	2,00	0,625ab
0,00	4,00	0,500a
0,50	0,00	0,000---
0,50	2,00	1,750b
0,50	4,00	0,783ab
0,10	0,00	0,150a
0,10	2,00	0,000---
0,10	4,00	0,200a

Tablo 4.6.'da görüldüğü gibi istatistiki sonuçlara göre Yaltinski Nod kültüründe 3 farklı grup tespit edilmiştir. 0.5 mg/l IAA – 0.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamında herhangi bir gelişme görülmemişken, en iyi gelişme 0.5 mg/l IAA – 2.0 mg/l BAP hormon ilaveli MS ortamlarında görülmüştür ve diğer hormon ilaveli MS ortamlarında ise normal gelişme tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Prunus amygdalus* cv Yaltinski'de nod kültürü

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bitki doku kültürü teknikleri üretimi zor olan bitkilerin daha kolay üretilmesini, seçilen üstün genotiplerin hızla çoğaltılmasını mümkün kıldığı için klasik ıslah yöntemleriyle yapılan üretimden çok daha avantajlıdır. Aynı zamanda hastaliksız bitkilerin üretimi ile beraber bitkide standardizasyonu ve meyve kalitesini artırmayı da sağlamıştır.

Bu çalışmada in vitro doku kültürü tekniklerinden yararlanılarak bölgemizde (Güney Doğu Anadolu Bölgesi) geniş bir yayılma alanı bulan *Prunus amygdalus*'un Yaltinski ve Garrigues çeşitlerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Ve görülmüştür ki bademin bu çeşitlerine ait embriyo, meristem ucu ve nod eksplantlarının değişik hormon kombinasyonlarında klonal çoğaltım mümkündür.

4.1.1.'de verilen sonuçlara göre *P. amygdalus*'un Yaltinski embriyo eksplantlarının kullanıldığı çalışmalarda kök gelişiminin MS bazal, gövde gelişiminin ise IAA (0.5 mg/l) içeren MS ortamlarında maksimum düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

4.1.2.'de verilen sonuçlara göre *P. amygdalus*'un Garrigues embriyo eksplantlarının kullanıldığı çalışmalarda kök ve gelişiminin MS bazal ortamında maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak: IAA/BAP hormonlarının değişik kombinasyonlarda kullanıldığı Garrigues ve Yaltinski çeşidinin embriyo eksplantının gelişiminde hormon bulundurmeyen stoklardan hazırlanmış MS ortamında daha iyi gelişme gösterdiği, IAA bulunmayıp yüksek düzeyde BAP (4.0 mg/l) bulunan ortamların kök gelişimine olumsuz etki ettiği tespit edilmiştir.

Başka bir araştırmada şeftali, tüysüz şeftali ve badem kültüre alınmış ve kök gelişimini en iyi IBA içeren ortamda M26 göstermiştir (Damian cd., 1992). Bizim çalışmamızda ise Yaltinski ve Garrigues çeşitleri en iyi kök gelişimini IAA içerip kinetin bulundurmeyen ortamda gösterdiği gözlenmiştir.

4.1.3.'de verilen sonuçlara göre *P. amygdalus*'un Yaltinski çeşitinin IAA/KİNETİN hormonlarının değişik kombinasyonlarda kullanıldığı sonuçlardır. Buna göre *Prunus amygdalus*'in Yaltinski çeşidi Kinetin (2.0 mg/lit) hormonunun bulunduğu stoklardan hazırlanmış MS ortamında kök gelişiminin, MS bazal ortamında ise gövde gelişiminin maksimum olduğu belirlenmiştir.

4.1.4'de verilen sonuçlara göre *P. amygdalus*'un Garrigues çeşidinin embriyo eksplantlarının kullanıldığı çalışmalarda kök gelişiminin MS bazal ortamında maksimum düzeyde geliştiği, gövde gelişiminin ise IAA (4.0 mg/lit) içeren MS ortamında maksimum düzeyde geliştiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; IAA/KİNETİN hormonlarının değişik kombinasyonlarda kullanıldığı Garrigues ve Yaltinski çeşidinin embriyo eksplantlarının gelişiminde hormon bulundurmeyen stoklardan hazırlanmış MS ortamının kök gelişimine olumlu etki ettiği, yüksek düzeyde IAA/Kinetinin (2veya 4 mg/lit) beraber bulunduğu ortamların kök ve gövde gelişimine olumsuz etki ettiği ortaya konulmuştur.

Acıbadem (*Prunus dulcis*)'in mikro filizlerinin in-vitro'da korunmasına etki eden faktörler incelendiğinde ABA'nın (0.0'dan 11.4 M'e) büyümeyi önemli derecede azalttığı gözlenmiştir (Shipli vd., 1999). Bizim çalışmalarımız sonucunda Garrigues ve Yaltinski'nin BAP'ın yüksek konsantrasyonları kullnaıldığı ortamlarda köklenmesini ilk 30 günde yavaşlatıcı etki yaptığı, IAA'nın yüksek konsantrasyonlu kullanıldığı ortamlarda ise ilk 30 günde gövde gelişimini yavaşlattığı gözlemlenmiştir.

P. amygdalus'un Yaltinski ve Garrigues çeşitlerinin sürgün ucu kültürü sonuçlarına göre: Yaltinski çeşidi hormon bulundurmeyen hazır MS ortamlarında yeterince gelişme göstermediği; BAP 4.0 mg/lit ilaveli MS ortamında maksimum gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Garrigues ise IAA 1.0 mg/lit-BAP 2.0 mg/lit ortamında maksimum gelişme göstermişken IAA 1.0 mg/lit'li MS ortamında kallus gelişimi göstermemiştir. Gürel ve Gülşen (1998) IBA/BAP'lı ortamlarda yaptığı çalışmalarda hormonsuz ortamlarda sürgün ucu gelişimi gözlenmiştir.

P. amygdalus'un Yaltinski çeşidinin IAA/BAP hormonlarının kullanıldığı değişik kombinasyonlardaki nod eksplantlarının hazır MS kullanıldığı ortamlardaki sonuçlarına göre; hormonsuz hazır MS bulunan ortamda gelişmenin maksimum

düzeyde olduğu IAA 0.5mg/l-BAP 2.0 mg/l, IAA 0.5mg/l –BAP 0.0 mg/l hormonlarının bulunduğu ortamda ise gelişmenin hiç olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.6). Sonuç olarak burada BAP'ın nod gelişimi için gerekli olduğu ancak yüksek oranlarda kullanımı (2 veya 4 mg/l) sürgünlerin sonradan gelişimini yavaşlatıcı etki ettiği belirlenmiştir.

Bir yaşındaki Na Plus Ultra ve Nonpareil fidanlık bitkilerinin kullanıldığı bir çalışmada bu bitkilerden alınan sürgün ucu ve nod eksplanlarının kullanıldığı 4 haftalık gelişme sonucunda, Gelişme IBA+BA ilaveli MS ortamlarında sağlanmıştır (Saeed, 1998). Bizim yaptığımız nod kültürü çalışmasında da en iyi gelişme IAA+BAP ilaveli MS ortamında olduğu gözlenmiştir. Buna göre nod gelişiminde IAA hormonunun gerekliliği açıkça görülmektedir.

Garbera jamesonii Bolus.'da sürgün ucu örnekleri 5.0 mg/l. kinetin ve 0.5 mg/l. IAA içeren standart MS ortamında en yüksek sürgün oluşumunu gerçekleştirmiştir (Mariska ve vd., 1991). Prunus amygdalus'un Yaltinski çeşidinde en iyi sürgün gelişiminin 4.0 mg/l. BAP ve 0.0 mg/l. IAA içeren standart MS ortamında, Garrigues çeşidinde ise en iyi sürgün gelişiminin 2.0 mg/l. BAP ve 1.0 mg/l. IAA içeren standart MS ortamında olduğu gözlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

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

Berkmann, L. (1960). Growth And Division Of Single Cells Of Higher Plants In Vitro. J. GEN. Physiol. 43, 841-851

Bhojwani, S. S., and Razdan, M. K. (1983). *Plant Tissue Culture; Theory and Practice*, L sevier-Amsderdam, Oxford, New York.

Caboni-E; Speranza-S; Damiano-C, (1994) Effect of gibberellic acid on in vitro rooting of almond. *Advances-in-Horticultural-Science*.8: 1 53-55.

Damiano-C; Chiariotti-A;Caboni-E;Quarta-R; Boumis-G (1992) Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruit species in vitro. *Acta-Horticulturae*.300,211-224.

De la Pena, A., Lörz, H., Schell-J. (1987). Transgenic Plants obtained by infecting DNA into young Floral Fillers. *Nature*, 325, 274-276.

Dix, J. Philip. (1990). *Plant Cell Line selection. Procedures and applications*. Weinheim New Work, Borel, Cambridge.

Dodds, J. H., Roberts . W. (1986) Experiments in plant tissue culture, pp. 113-121, USA.

Dokuzoğuz. M, Gülcan R.,(1979) Badem yetiştiriciliği ve sorunları Tübitak XV. Kuruluş yılı Bilimsel yayınları.80 s.

Franc-P (1998) The effect of auxins and their cofactors on root formation in peach rootstocks in vitro. *Zahradnictvi*.25: 2,41-46.

Gautheret, R. J. (1938). Sur le repiquage des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. CR. Acad. Sci., **206**, 125-127

Grosser, J. W. (1985). Tissue culture and biotechnology: Additional research tools for Citrus improvement. *The Citrus Industry*.33-35.

Gürel, S. (Gülşen, Y. (1998) The Effect of IBA and BAP on In-vitro Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.) Tr. J. of Botany. 22, 375-379, Turkey

Küden A. (2000) Badem Yetiştiriciliği TÜBİTAK TARP yayınları 18 s.

Lauri-P; Caboni-E; Damiano-C; Sorvari-S (ed); Karhu-S (ed); Kaneryo-E (ed); Pihakaski-S (2001) In vitro adventitious shoot regeneration from vegetative apices of almond and other prunus species. Proceedings of the Fourth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Tampere Finland 2-7 July 2000 Acta-Horticulture 560, 403-406.

Mariska ve vd. (1991). In vitro clonal propagation of gerbera. Plant Breed. Abst., 61 (4):499.

Marcotrigiano M., Lagannatan L., (1988) Hrt Science, 23, 226-227.

Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J. (1954). Plant Tissue Cultures Produced From Single Isolated Plant Cells, Science, 119, 877-878

Murashige, T., Skoog, F. (1962). *Physiol. Plant.*, 15: 473-493.

Nehra, N. S., Kartha, K. K. (1994). Meristem and Shoot Tip Culture: Requirements and applications. In: Vasil IK and Thorpe TA (eds), Plants cell and tissue culture, pp. 37-70. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Netherlands

Nobecourt, P. (1938). Sur les proliférations spontanées de fragments de tubercules de carotte et leur culture sur milieu synthétique, Bull Soc. Bot. Fr. 85, 1-7

Parrott, W. A., Merkle, S. A., Williams, E. G. (1993). Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer system. In : Murray, D. R. (Eds.). *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp.158-200, C. A. B International, UK.

Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro Culture of Higher Plants*, pp 183-230, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Rana-HS; Chadha-TR. (1989). Studies on the clonal propagation of *Prunus* species and their relationship with some biochemical characters. *Progressive – Horticulture*.21: 3–4,329-335.

Shibli-RA; Shatnawi-MA; Ajlouni-MM; Jaradat-A; Adham-Y (1999) Slow growth in vitro condeavation of bitter almond (*Amygdalus communis* L) *Advances –in Horticultural –Science*.13: 3, 133-134

Smith, R. (1992). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. pp.1-27, Academic Press Inc.,

Thorpe, T. A., Harry, I. S., Kumar, P. P. (1991). Application of micropropagation to forestry. In: Micropragation, technology and application. Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, pp.311-336.

Tisserat, B. (1991). Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon, R. A. (Eds.), *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, pp.79-105, IRL Press, Oxford.

Traveria F. H. (2000) Estudio integral De las Respuestas Ecofisiologicas Al Estrés Hídrico: caracterización De Variedades De Almendro. Universitat de Barcelona Divisio de Ciències Experimentals i matemàtiques, Departament de Biologia Vegetal Facultat de Biologia. 140 s.

Vejsadova –H; Gutierova-N (1997) Methods of micropropagation and their potential for the reintroduction of endangered wild flowers and woody plants. *Acta Pruhonciana*.64,72-80.

Warren, G. (1991). The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In : Stafford, A., Warren, G. (Eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*, pp 83-100, Open University Press, Milton Keynes.

Wenzel, G., Köhler, F., Schuhmann, R., Foroughi-Wehr, B. (1984). *In Vitro Selection Towards Resistyance in: Efficiency in Plant Breeding*, Eucarpia, Wageningen.



EKLER

EK 1. MS Ortamının Kimyasal Bileşenleri

KİMYASAL	mg/lt
NH_4NO_3	1650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KNO_3	1900
H_3BO_3	6.2
KH_2PO_4	170
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine HCl	0.5
Nicotinic HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Sucrose	30 g/lt
Agar	8-10 gr/lt

EK 2. Stok Solüsyonlar*

	Kimyasallar	Oranlar (mg/100 ml)
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
B-	MgSO ₄ . 7H ₂ O	3700
	MnSO 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-2H ₂ O	373
D-	Thiamine HCl	1
	Pyridoxine HCl	5
	Nicotinic HCl	5
	Glycine	20

EK 3. Sonradan İlave Edilen Kimyasallar*

Kimyasal	mg/lit
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
Myo-inositol	100
Sucrose	30 g/lit
Agar	8-10 gr/lit

BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR

Yapar H., Atlı S.H., Aytekin T., Can C., Özaslan M. (2004) *Bademde (Prunus amygdalus L.) Doku Kültürü Çalışmaları*. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran, Adana. Sayfa: 49.