



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**BRASSICA TÜRLERİ (*Brassica oleracea* L. X *Brassica rapa* L.) ARASINDA
MELEZLEME YOLUYLA LAHANA KÖK URU (*Plasmodiophora brassicae* Wor.)'NA
KARŞI DAYANIKLI HATLARIN GELİŞTİRİLMESİNDE EMBRİYO KÜLTÜR
TEKNİĞİNİN KULLANIM OLANAKLARI**

DOKTORA TEZİ

**Ayten DEMİR
(08210516)**

Tezin Savunma Tarihi : 05/10/2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan KURT

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi PYO. ZRT. 19011.11.011 nolu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalında

Ayten DEMİR Tarafından Hazırlanan

**BRASSICA TÜRLERİ (*Brassica oleracea* L. X *Brassica rapa* L.) ARASINDA
MELEZLEME YOLUYLA LAHANA KÖK-URU (*Plasmodiophora brassicae*
Wor.)'NA KARŞI DAYANIKLI HATLARIN GELİŞTİRİLMESİNDE
EMBRİYO KÜLTÜR TEKNİĞİNİN KULLANIM OLANAKLARI**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından .../.../... tarihinde yapılan sınav ile DOKTORA
tezi olarak kabul edilmiştir.**

Başkan : Prof. Dr. Orhan KURT
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ş. Metin KARA
Ordu Üniversitesi

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. İsmail ERPER
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. İsmail SEZER
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ YAZIYOR

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR

Enstitü Müdürü

Danışman Hocam Prof. Dr. Orhan KURT'a, Anneanneme, Dedeme ve aileme;

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca her çalışmamda olduğu gibi bu tezin planlanması yürütülmesi ve yazımı aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman bilgi ve tecrübelerini paylaşan, yurtdışında bulunduğu dönemlerde de bu çalışmada ilgisini ve desteğini gördüğüm saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Orhan Kurt'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde benden fikir ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. İsmail ERPER ve Yard. Doç. Dr. İsmail SEZER'e teşekkür ederim. Bitki Koruma Bölümünden ders alma imkanı sunan, bilgi ve tecrübelerini paylaştığım sayın hocam Prof. Dr. Berna Tunalı'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bölüm hocalarımdan bu çalışma esnasında maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Selim Aytaç'a çok teşekkür ederim. Bu çalışmanın yürütülmesi esnasında yardımlarını gördüğüm Yard. Doç. Dr. Hüseyin UYSAL'a ve Araş.Gör. M.Safa HACIKAMİLOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın yürütülmesi esnasında yardım aldığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü stajyer ve mesleki uygulama dersi öğrencilerine sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitim dönemlerimde de maddi ve manevi desteğini gördüğüm merhum anneanneme ve dedeme şükranlarımı sunuyorum. Ruhunuz şad olsun. Maddi ve manevi desteklerinden dolayı babam Arslan DEMİR ve Annem Naciye DEMİR'e, kardeşlerim (Nazlı, Zahide, Aysel, Murat ve Hüseyin)'e ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkür ediyorum.

Eylül 2015

Ayten DEMİR
Ziraat Yüksek Mühendisi

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	VII
İÇİNDEKİLER	IX
ÇİZELGELER LİSTESİ	XIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVII
ÖZET	XIX
ABSTRACT	XXI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Çimlenme Sorunu Olan Türlerin Tohumlarının Çimlendirilmesi Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler.....	5
2.2. Mutlak Parazit Bitkilerinin Tohumlarının Çimlendirilmesinde Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler	6
2.3. Yaşam Çemberinin Kısaltılmasında Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler.....	6
2.4. Uyuşmazlık Nedeniyle Gelişemeyen Embriyoların Gelişimini Sağlamak Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler	7
2.5. Erken Olgunlaşan Sert Çekirdekli Meyvelerde Zayıf Embriyo Gelişimini Önlemek Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler.....	9
2.6. Haploid Bitkilerin Elde Edilmesinde Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler.....	9
2.7. Embriyo Gelişim Mekanizmasını İncelemek Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler.....	10
2.8. Embriyo Kültüründe Kullanılan Besi Ortamlarına İlişkin Genel Bilgiler.....	11
2.9. Embriyo Kültüründe Genotipin Etkisine İlişkin Genel Bilgiler.....	12
2.10. Embriyo Kültüründe Kullanılan Sterilizasyon Yöntemi ile İlgili Genel Bilgiler.....	13
2.11. Türlerarası Melezlemeye İlişkin Genel Bilgiler.....	13
2.12. Lahana Kök Uru Hastalığının Özelliklerine İlişkin Genel Bilgiler	15
2.13. Lahana Kök Uru Hastalık Etmeninin İzolasyonu ve Muhafazasına İlişkin Genel Bilgiler.....	17
2.14. Lahana Kök Uru Hastalığının Etkinliğine İlişkin Genel Bilgiler.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. MATERYAL	21
3.1.1. Bitki Materyali.....	21
3.1.2. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlemesinde Kullanılan Tohum Materyali	21
3.1.3. Toprak Materyali.....	22
3.1.3.1. Ebeveyn Bitkilerin Çimlendirilmesinde Kullanılan Toprak Materyali.....	22
3.1.3.2. Yetiştirme Aşamasında Kullanılan Toprak Materyali.....	22
3.1.3.3. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirildiği Toprak Materyali.....	22
3.1.3.4. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Toprak Materyali.....	22

3.1.3.5. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Kum Materyali.....	23
3.1.3.6. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Perlit Materyali.....	23
3.1.4. Besi Ortamı.....	23
3.1.4.1. Embriyo Kültür Ortamı.....	23
3.1.4.2. Sürgün Gelişimi Ortamı.....	23
3.1.4.3. Kök Gelişimi Ortamı.....	23
3.1.4.4. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Besi Ortamı.....	23
3.1.4.5. Kök Uru Hastalık Testlenmesinde Kullanılan Spor Kültürü.....	24
3.1.4.6. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Diğer Materyaller.....	24
3.2.YÖNTEM.....	24
3.2.1. Toprak Hazırlığı	24
3.2.1.1. Ebeveyn Bitkilerin Tohumlarının Çimlendirilmesinde Kullanılan Toprağın Hazırlanması.....	24
3.2.1.2. Yetiştirme Aşamasında Kullanılan Toprağın Hazırlanması	25
3.2.1.3. Tarla Koşullarında Kullanılan Toprağın Hazırlanması.....	25
3.2.1.4. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Toprağın Hazırlanması.....	25
3.2.1.5. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Kum Materyalinin Hazırlanması	26
3.2.1.6. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Perlit Materyalinin Hazırlanması.....	26
3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	26
3.2.2.1. Embriyo Kültür Ortamının Hazırlanması.....	26
3.2.2.2. Sürgün Gelişimi Ortamının Hazırlanması.....	27
3.2.2.3. Kök Gelişimi Ortamının Hazırlanması	27
3.2.2.4. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Besi Ortamının Hazırlanması.....	27
3.2.3. Sterilizasyon.....	27
3.2.3.1. Tohum Sterilizasyonu.....	27
3.2.3.2. Harnup Sterilizasyonu.....	29
3.2.3.3. Materyallerin Sterilizasyonu.....	29
3.2.4. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Spor Materyalinin Hazırlanması.....	29
3.2.5. Embriyo Kültürü Amacına Yönelik Yapılan Uygulamalar.....	32
3.2.5.1. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	32
3.2.5.2. Brassica Türleri Arasında Melezlemelerin Yapılması.....	32
3.2.5.3. Harnup Hasadı.....	34
3.2.5.4. Melez Embriyoların Kültürü	34
3.2.5.5. Melez Embriyolardan Bitkicik Oluşumu.....	35
3.2.5.6. Sürgün ve Kök Gelişim Ortamlarına Şaşırtma.....	35
3.2.5.7. Alt Kültüre Alma.....	36
3.2.5.8. Haploid Bitkilerin Katlanması	36
3.2.5.9. Katlama Sonrası Alıştırma ve Şaşırtma.....	37
3.2.5.10. Double Haploid Melez Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Vernalizasyon.....	38
3.2.5.11. Double Haploid Melez Bitkilerin Kendilenmesi ve Tohum Hasadı.....	38
3.2.6. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesinde Uygulanan Yöntemler.....	39
3.2.6.1. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulacak Steril Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	39
3.2.6.2. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulacak Steril Bitkilerin Aşılı Toprağa Şaşırtılması ve Sulanması.....	41

3.2.6.3. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulan Bitkilerde Hastalık Okumalarının Yapılması.....	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Ebeveyn Bitki Sayısı	43
4.2. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayısı.....	44
4.3. Hasat Edilen Melez Harnup Sayısı.....	46
4.4. Harnup Oluşumundaki Başarı Oranı.....	47
4.5. Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayısı.....	48
4.6. Harnup Başına Ekilen Embriyo Oranı.....	49
4.7. Çimlenen Embriyo Sayısı.....	50
4.8. Haploid Bitki Sayısı	51
4.9. Embriyo Başına Haploid Bitki Oluşum Oranı.....	54
4.10. Katlamaya Alınan F1 Haploid Bitki Sayısı.....	55
4.11. Sera Koşullarında Yetiştirilen Double Haploid F1 Bitki Sayısı.....	55
4.12. Katlamada Başarı Oranı.....	56
4.13. İklimlendirme Ünitesine Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayısı.....	56
4.14. Vernalize Edilmiş Double Haploid F1 Bitki Sayısı.....	57
4.15. Vernalizasyondaki Başarı Oranı.....	57
4.16. Double Haploid F1 Bitkilerinden Hasat Edilen Tohum Sayısı.....	58
4.17. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesi İçin Yetiştirilen Double Haploid F2 Bitki Sayısı.....	58
4.18. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Alınan F2 Double Haploid Bitki Sayısı.....	60
4.19. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesi Sonrası Yaşamını Sürdüren Double Haploid F2 Bitki Sayısı.....	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Hastalık Testlemesinde Kullanılan Tohum Sayıları ve Ait Oldukları Melez Kombinasyonlara İlişkin Veriler.....	22
Çizelge 3.2. Kullanılan Besi Ortamları ve Kimyasal İçeriklerine İlişkin Veriler...	28
Çizelge 3.3. Testlemede Kullanılan DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Tohum Sayılarına İlişkin Veriler.....	40
Çizelge 4.1. Ebeveyn Bitkilerin Ekim Zamanları, Yetiştirme Aşamalarında Kullanılan Alanlar ve Yetiştirilen Bitki Sayılarına İlişkin Veriler.....	43
Çizelge 4.2. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayılarına İlişkin Veriler.....	45
Çizelge 4.3. Türlerarası Melezlemelerde Oluşan Melez Harnup Sayılarına İlişkin Veriler.....	46
Çizelge 4.4. Melezlenen Çiçek Başına Harnup Oluşum Oranlarına İlişkin Veriler.....	48
Çizelge 4.5. Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayılarına İlişkin Veriler.....	48
Çizelge 4.6. Besi Ortamına ekilen Embriyo Sayısı ile Harnup sayısı ve Harnup Başına Ekilen Embriyo Oranına İlişkin Veriler.....	50
Çizelge 4.7. Çimlenen Embriyo Sayısı, Yaşatılabilen Embriyo Sayısı ve Embriyo Yaşama Oranına İlişkin Veriler.....	50
Çizelge 4.8. Sürgün ve Kök Gelişim Sonrası Bitki Sayısı ile Toplam Haploid Bitki Sayısına İlişkin Veriler.....	53
Çizelge 4.9. Haploid Bitki Oluşumundaki Başarı Oranlarına İlişkin Veriler.....	54
Çizelge 4.10. Katlamaya Alınan F1 Haploid Bitki Sayılarına İlişkin Veriler.....	55
Çizelge 4.11. Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayılarına İlişkin Veriler.....	56
Çizelge 4.12. Katlamaya Alınan Bitki Sayısı, Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayısı ve Katlamada Başarı Oranlarına İlişkin Veriler.....	56
Çizelge 4.13. Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayılarına İlişkin Veriler	57
Çizelge 4.14. Vernalize Edilip Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitkilerine Ait Veriler.....	57
Çizelge 4.15. Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayısı, Vernalizasyondan Çıkan Bitki Sayısı ve Vernalizasyondaki Başarı Oranlarına İlişkin Veriler.....	58
Çizelge 4.16. Kendileme Sonrası Tutan Harnup ve Tohum Sayılarına İlişkin Veriler.....	59
Çizelge 4.17. Testleme İçin Yetiştirilen Double Haploid Bitkilere İlişkin Veriler.....	59
Çizelge 4.18. Testlemeye Alınan Double Haploid Bitki Sayılarına ilişkin Veriler.....	60
Çizelge 4.19. Testleme Sonrası Hastalık Okumasına İlişkin Veriler.....	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Kültüre Alınan Brassica Türleri ve Türler Arasındaki İlişkiler.....	2
Şekil 3.1. Toprak Hazırlığı ve Ekim a) Viyole Toprak Karışımı Hazırlığı, b) Viyole Tohum Ekimi.....	24
Şekil 3.2. Araziden Toprak Alımı. a) Toprak Profilinin Ölçülmesi, b) Toprak Örneğinin Alınması.....	25
Şekil 3.3. Testlemede Kullanılan a) Perlit b) Kum Materyallerinin Hazırlanması.	26
Şekil 3.4. Sterilizasyon. a) Hastalık Testlemesi İçin Tohum Sterilizasyonu b) Embriyo Kültürü İçin Harnup Sterilizasyonu.....	29
Şekil 3.5. Toprakta Spor İzolasyonu Çalışmaları. a) Lokasyonlara Ait Toprak Örnekleri, b) Hastalık Sporlarının Su Agarına Tutunması.....	30
Şekil 3.6. İzolatların hazırlanması a) Epondor Tüplerine Örnek aktarılması, b) Vortek yapılması.....	30
Şekil 3.7. Mikroskop Altında a) Spor Tespiti b) Mikroskop Altında Sporların Genel Görünüşü	31
Şekil 3.8. a) Toprak, Kum ve Perlit Karışımının Steril Kavanozda Karıştırılarak Saksılara Aktarılması, b) Testlemede Kullanılacak Sporla Toprak Karışımının 1 Hafta İnkübe Edilmesi.....	31
Şekil 3.9. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Vernalizasyonu a) Saksılara Şaşırtılması, b) Sera Koşullarında Gelişime, c) Dürme Çeşidinin ve d) Şalgam Hatlarının Vernalize Edilmesi.....	32
Şekil 3.10. Vernalizasyon Sonrası Ebeveyn Bitkilerin a) Araziye Şaşırtılması, b) İzolasyon Kafesleriyle İzole Edilmesi.....	33
Şekil 3.11. Arazi Koşullarında a) Çiçek Tomurcuğu Oluşumu, b) Çiçeklenme, c) Emaskulasyon, d) Melezleme	34
Şekil 3.12. Ebeveyn Bitkilerden a)Harnup Hasadı, b)Harnuplardan Embriyoların Çıkarılması.....	34
Şekil 3.13. a) Tohum Taslaklarının, b) Binoküler Mikroskop Altında Embriyoların ve c) Besi Ortamındaki Ekilmiş Embriyoların Genel Görünüşleri.....	35
Şekil 3.14. Besi Ortamında a) Embriyo Farklılaşması ve b) Sürgün Oluşumu.....	35
Şekil 3.15. Besi ortamında a) Sürgün Gelişimi, b) Kök Gelişimi, c) Gelişmesini Tamamlamış Bitkilerin Genel Görünüşü.....	36
Şekil 3.16. a) Alt Kültüre Alınmadan Önce ve b) Alt Kültüre Alındıktan Sonra Bitkiciklerin Genel Görünüşü.....	36
Şekil 3.17. Haploid Bitkilerin; a) Köklenme Ortamından Alınması, b) Köklerin Agardan Temizlenmesi, c) Katlama Ortamına Alınması, d) Katlamaya Alınan Bitkilerin Karanlık Ortama Aktarılması.....	37
Şekil 3.18. Katlama sonrası Bitkileri; a) Akklimize Edilmesi, b) Toprağa Şaşırtılması, c) Saksıda Akklimize Edilmesi.....	37
Şekil 3.19.İklimlendirme Odasında Vernalize Olan Bitkilerin Genel Görünüşü...	38
Şekil 3.20. Vernalizasyon Sonrası Sera Koşullarında Double Haploid Bitkilerde	39

a) Kendileme ve b) Harnup Oluşumu.....	
Şekil 3.21. Testleme için; a) Tohum Sterilizasyonu, b) Besi Ortamına Tohum Ekimi, c) Double Haploid Melez Bitkiler, d) Kontrol (Dürme) Bitkilerin Genel Görünüşü.....	40
Şekil 3.22. Testlemeye Alınan Bitkilere; a) Su Verilmesi, b) Gelişimlerini Sürdürmesi, c) Saksıların Örtülerinin (Aliminyum Folyo) Açılması.....	41
Şekil 4.1. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayılarının (adet) Kombinasyonlara Göre Dağılımı.....	45
Şekil 4.2. Türlerarası Melezlemelerde Oluşan Melez Harnup Sayılarının Oransal Olarak Kombinasyonlara Dağılımı.....	47
Şekil 4.3. Besi Ortamına Ekilen Embriyoların Kombinasyonlara Göre Oransal Dağılımı.....	49
Şekil 4.4. Embriyo Yaşama Oranlarının Melezleme Kombinasyonlarına Göre Dağılımı.....	51
Şekil 4.5. a) DxECD-01, b) DxECD-02 ve c) DxECD-03 Melez Kombinasyonuna ait Çimlenen Embriyoların Genel Görünüşü.....	52
Şekil 4.6. DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Bitkilerin Genel Görünüşü...	54
Şekil 4.7. Haploid Bitki Oluşum Oranlarının Kombinasyonlara Göre Dağılımı....	55
Şekil 4.8. DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Bazı Bitkilerin ve Kontrol (Dürme) Çeşidinin Testleme Sonrası Kök Uru Hastalığına İlişkin Genel Görüntüler.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANGAİ	:	Ali Nihat Gökyiğit Araştırma İstasyonu
AGAR	:	Agar
BAP	:	Benzil Amino Pürin
CMC	:	Sodyum Karboksimetil Seliloz
CaCl₂H₂O	:	Kalsiyum Klorür
CuSO₄5H₂O	:	Bakır Sülfat
CoCl₂6H₂O	:	Kobalt Klörür
ECD	:	Avrupa İrk Ayırım Seti (European Clubroot Differential)
FeSO₄7H₂O	:	Demir Sülfat
gr, mg, ml, µl	:	Gram, miligram, mililitre, mikrolitre
Glycin	:	Glisin
H₃BO₃	:	Borik asit
IAA	:	İndole-3- Asetik Asit
KTAE	:	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
KNO₃	:	Potasyum Nitrat
KH₂PO₄	:	Potasyum Sülfat
LAB	:	Laboratuar
MgSO₄7H₂O	:	Magnezyum Sülfat
MS	:	Murashige and Skoog Besi Ortamı
MnSO₄H₂O	:	Mangan Sülfat
Na₂-EDTA	:	Sodyum-Edta
Na₂MoO₄H₂O	:	Molibdik asit
NH₄NO₃	:	Amonyum Nitrat
Nicotinic- acid	:	Nikotirik Asit
OMÜ	:	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Pyrodoxine-HCl	:	Pyridoksin
Thiamine-HCl	:	Thiamin

**BRASSICA TÜRLERİ (*Brassica oleracea* L. X *Brassica rapa* L.) ARASINDA
MELEZLEME YOLUYLA LAHANA KÖK URU (*Plasmodiophora brassicae*
Wor.)'NA KARŞI DAYANIKLI HATLARIN GELİŞTİRİLMESİNDE EMBRİYO
KÜLTÜR TEKNİĞİNİN KULLANIM OLANAKLARI**

ÖZET

Bu araştırma; Brassica türleri arasında melezlemeler yaparak lahana kök uru hastalığına dayanıklı hatlarının geliştirilmesinde embriyo kültür tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde, iklimlendirme ünitesinde, doku kültür odasında, serada ve tarla koşullarında yürütülmüştür.

Lahana (*B. oleracea* L.) türleri içinde yer alan Dürme lahana çeşidi ile şalgam (*B. rapa* L.) türü içinde yer alan ECD-1, ECD-2, ECD-3 ve ECD-4 şalgam hatlar arasında, sera koşullarında 831 çiçek tomurcuğu melezlenmiştir. Bu melezlemelerden oluşan toplam 284 adet harnuptan, toplam 2663 adet primitif embriyo besi ortamına aktarılmıştır. Besi ortamına aktarılan embriyolardan toplam 15 adet embriyo yaşatılmış ve bunlardan toplam 813 adet haploid bitki elde edilmiştir. Embriyo başına haploid bitki oluşum oranının % 30.5 olduğu saptanmıştır.

Elde edilen haploid bitkilerden toplam 688 bitki katlamaya alınmış olup, katlama sonrası 348 sağlıklı double haploid bitki sera koşullarına aktarılmış olup bu bitkilerden gelişmelerini tamamlayabilen toplam 263 double haploid bitki vernalizasyona alınmıştır.

Vernalizasyona alınan double haploid bitkilerden toplam 162 adet double haploid bitki sağlıklı olarak sera koşullarına aktarılmış olup bu bitkilerden çiçeklenme periyoduna gelen bitkilerde yapılan kendilemeler sonucunda sadece DürmeXECD-4 melez kombinasyonuna ait toplam 8 melez bitkiden toplam 148 harnup ve bu harnupların harman edilmesi sonucu toplam 293 adet tohumdan oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur.

Oluşturulan gen havuzundaki tohumlar, testlemek amacıyla steril koşullarda ekilerek toplam 210 adet double haploid kendilenmiş bitki yetiştirilmiş ancak bu bitkilerden sadece 95 tanesinde testleme yapılabilmektedir. Testlemeye tabi tutulan bu bitkilerden sadece 33 tanesinde hastalık kaydı yapılabilmektedir. Böylece lahana kök uru hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıyan 33 double haploid kendilenmiş bitkiden oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kök-uru Hastalığı (*Plasmodiophora brassicae* Wor.), Türlerarası melezleme, Embriyo Kültürü.

**POSSIBILITY OF USE EMBRYO CULTURE TEKNIQU TO IMPROVEMENT
RESISTANCED LINES AGAINS TO *Plasmodiophora brassica* Wor. VIA
INTERSPESIFIC HYBRIDISATION BETWEEN BRASSICA SPECIES (*Brassica
oleraceae* L. X *Brassica rapa* L.)**

ABSTRACT

This research was carried out at Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, in growth room, tissue culture room, greenhouse and field condition between 2010 and 2014, the possibility of use embryo culture technique in order to improvement resistance lines against clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) via interspecific hybridization between *B. oleraceae* L. and *B. rapa* L.

Study results: 831 flowers were hybridized between *B. oleraceae* L. var. Dürme and *B. rapa* L. Line ECD-1, ECD-2, ECD-3 and ECD-4 and 284 bulbs were harvested for embryo culture. 2663 primitif embriyos were transferred to tissue culture medium and 15 of them successfully germinated and produced 813 haploid hybrid plants. So that, the percentage of haploid plant per embryo was found 30.5%

688 haploid plants were treated with colchicine to doubling chromosomes to get double haploid plants and 348 double haploid plants transferred to greenhouse condition for completing their growth. 263 double haploid plants of them were transferred to vernalization rooms.

162 double haploid plants transferred green condition after 3 mounts vernalisation and self-crossing was done in flowering condition. 148 bulbs were harvested from 8 hybrid plants from DurmexECD-4 hybrid combination and a gene poole created after treshing with 293 seeds.

210 hybrid double-haploid plants were grown in vitro condition to grown sterile plants for clubroot disease tests but only 95 plants tedted for disease. After Clubroot disease testing, survival 33 plants were transferred to the greenhouse condition for completion their growth. Finally, a gene poole created with this 33 plants.

Key Words: Clubroot Disease (*Plasmodiophora brassicae* Wor.), Interspecific hybridization, Embryo culture.

1. GİRİŞ

Brassicaceae familyası kültür bitkileri, süs bitkileri ve yabancı otlardan oluşan yaklaşık 375 cins ve 3200 türü kapsayan çok geniş bir familyadır. *Brassica* cinsi içerisinde yaklaşık 159 tür olmasına karşın ekonomik öneme sahip tür sayısı sadece 13 (Kurt ve diğ., 2011)'dir. Bu türler; *B.carinata* (Abyssinian mustard or Abyssinian cabbage), *B. elongata* (elongated mustard), *B. fruticulosa* (Mediterranean cabbage), *B. juncea* (Indian mustard, brown and leaf mustards, Sarepta mustard), *B. napus* (rapeseed, canola, rutabaga, swede/Swedish turnip/swede turnip), *B. narinosa* (broadbeaked mustard), *B. nigra* (black mustard), *B. perviridis* (tender green, mustard spinach), *B. rupestris* (brown mustard), *B. septiceps* (seventop turnip), *B. tournefortii* (Asian mustard), *B.oleracea* (kale, cabbage, broccoli, cauliflower, kai-lan, Brussels sprouts, kohlrabi) ve *B. rapa* syn *B. campestris* (Chinese cabbage, turnip, rapini, komatsuna)'dır (Anonymous, 2011).

Dünya lahana üretimi yaklaşık 71 milyon tondur (FAO, 2013). Türkiye beyaz baş lahana üretimi ise yaklaşık 493 bin tondur (TUİK, 2014). Karadeniz Bölgesi, 115 bin ton üretim ile Türkiye beyaz baş lahana üretiminin yaklaşık % 23.3'üne sahiptir (Anon, 2014). Karadeniz bölgesinde Samsun ili 92.68 bin ton üretim ile Türkiye beyaz baş lahana üretiminin % 18.8'ine sahiptir (TUİK, 2013; 2014). Ancak Karadeniz Bölgesinde lahana üretim potansiyeli daha fazlaladır. Bu potansiyele ulaşılmasını kısıtlayan etkenlerden birisi de lahana kök-uru hastalığıdır (Anonymous, 1995; 2005).

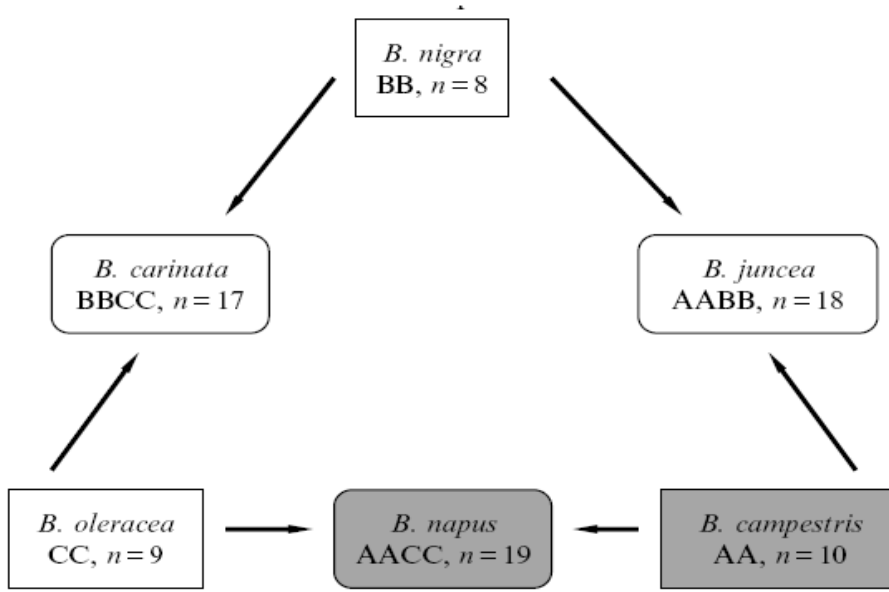
Lahana kök uru drenaj suyu, hareket halindeki hayvanlar, bulaşık toprak-alet-ekipman, hastalıklı fide, bitki ve bitki atıkları ile yayılmaktadır (Walker, 1952). Yayılım kaynaklarının çeşitliliği dikkate alındığında, bu hastalığın, yakın bir gelecekte, Karadeniz bölgesinde beyaz baş lahana yetiştiriciliğini sınırlandıracak önemli bir tehlike olacağını söylemek mümkündür.

Hastalıklarla etkili mücadele açısından en sağlıklı ve etkili yöntem, mukavim çeşit geliştirmektir. Mukavim çeşit geliştirmede yapılacak il iş; mukavemet genlerini taşıyan gen havuzundan, hassasiyetin bulunduğu gen havuzuna, geleneksel ya da biyoteknolojik yöntemler kullanılarak gen ya da genlerin aktarılmasıdır (Kurt, 2011).

Beyaz baş lahananın içinde yer aldığı *B. oleracea* L. türünün gen havuzunda, maalesef, lahana kök-uru hastalığına dayanıklılık sağlayan gen/genler yoktur. *B. oleracea* L. türünün akrabası olan, *B. rapa* L. (şalgam) gen havuzunda ise lahana kök-uru hastalığına

dayanıklılık arz eden genler bulunmaktadır. Dolayısıyla bu iki tür arasında yapılacak türlerarası melezlemeler ile lahana kök-uru hastalığına dayanıklılık genlerinin şalgam hatlarından, beyaz baş lahana hatlarına/çeşitlerine aktarılması mümkün olabilir.

Brassica türleri arasındaki sitogenetik ilişkiler ve genom yapıları ile ilgili bilgiler ilk kez Japon araştırmacı U (1935) tarafından ortaya konmuştur (Şekil 1). Bu araştırmacı Brassica bitkileri arasında üç temel diploid formun, *B. rapa* ($2n=20$), *B. oleracea* ($2n=18$) ve *B. nigra* ($2n=16$), ve 3 amfidiploid formun *B. napus* (AACC, $2n=38$), *B. juncea* (AABB, $2n=36$) ve *B. carinata* (BBCC, $2n=34$) bulunduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 1.1. Kültüre Alınan Brassica Türleri ve Türler Arasındaki İlişkiler (U, 1935)

Farklı kromozom sayısı ve farklı genoma sahip bu iki tür arasında yapılacak türlerarası melezlemeler sonucu oluşacak F1 döllerini normal olarak haploid ve kısır dırılar. Ancak F1 generasyonunda oluşacak primitif embriyolar, belirli bir fizyolojik olgunluk döneminde (yaklaşık 8-15 günlük), embriyo kurtarma tekniği ile besi ortamında kültüre alınmaları halinde, düşük frekansta da olsa fertil döller oluşturabilirler. Brassica türleri arasında yapılan melezlemelerden sağlıklı double haploid döllerin elde edilebilmesine ilişkin protokol Kurt ve diğ., (2010) tarafından ortaya konmuştur.

Bu çalışmanın amacıyla; Lahana kök-uru hastalığının Karadeniz Bölgesinde tespit edilen "ECD 16/31/31" ırkına karşı dayanıklı olduğu tespit edilen bazı şalgam türleri (Brassica rapa var rapifera line aaBBCC, line AabbCC, line AABBcc ve line AABBCC) ile kök-uru hastalığına hassas olduğu bilinen beyaz baş lahana çeşidi "Dürme" arasında melezleme yaptıktan sonra oluşacak primitif embriyolardan double haploid melez bitkilerin elde edilmesinde embriyo kültürünün (embriyo kurtarma tekniği) kullanım potansiyelini belirlemektir. Nihai hedef olarak da embriyo kültür tekniğinin başarılı olması durumunda

lahana kök uruna karşı muhavemet özelliği taşıyan genleri bünyesinde barındıran double haploid türlerarası melez genotiplerden bitkilerden bir gen havuzu oluşturmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Embriyo kültürü, olgun bitkilerin elde edilmesi amacı ile olgunlaşmamış veya olgun embriyoların steril koşullarda izole edilmesi ve büyütülmesini kapsayan bir teknik olarak tanımlanmaktadır. Embriyo kültürü; kültüre alınan embriyoların olgunlaşmamış veya olgun olma durumuna göre iki değişik şekilde uygulanmaktadır. Olgunlaşmamış embriyoların kültürü, genellikle normal doğal koşullarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolardan yaşama kabiliyetindeki bitkilerin elde edilmesi amacıyla yapılmaktadır. Olgun embriyoların kültürü ise, tohumun çimlenmesini engelleyen dormansi gibi faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla uygulanmaktadır.

Embriyo kültüründe, melezlemeden 2-3 hafta sonra embriyolar izole edilerek *in vitro* koşullarda kültüre alınmakta ve bu melez embriyolardan melez bitkiler elde edilebilmektedir. Embriyo kültür tekniğinin kullanım alanları ve amacına yönelik olarak yapılan çalışmalar ana başlıklar altında aşağıda verilmiştir.

2.1. Çimlenme Sorunu Olan Türlerin Tohumlarının Çimlendirilmesi Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Bazı bitki türlerinin tohumları dormansi veya tohum sterilitesi nedeniyle çimlenememektedir. Bu gibi durumlarda tohumdan olgunlaşmamış embriyo izole edilmekte ve besî ortamında kültüre alınmaktadır. Hatipoğlu (2001), bu tip çimlenme sorunu olan *Pinus armandii* x *Pinus corainensis* meleziine ait döllerden izole edilen embriyolardan fidelerin geliştirilebildiğini bildirmiştir.

Diğer taraftan Bhojwani ve Razdan (1996), bazı Hindistan Cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku geliştiğini, bu tip Hindistan Cevizlerinin “makapuno” olarak adlandırıldığını ve bunların tohumlarının normal koşullar altında çimlenemediğini; *in vitro* kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirildiğini ve bu yolla elde edilip tarlada yetiştirilen bitkilerin % 85'inin makapuno cevizlerinin özelliğini taşıdığını bildirmişlerdir.

2.2. Mutlak Parazit Bitkilerinin Tohumlarının Çimlendirilmesinde Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Bazı bitkilerin tohumları doğada çimlenebilmek için konukçuya ihtiyaç duyarlar. Bu tip problemlerin olduğu bitkilerde de embriyo kültürü yapılarak olgun bitkiler elde edilebilmektedir. Örneğin ökse otu; yarı parazit bir bitki olup, yapraklı ve ibreli ağaçların dalları ve gövdeleri üzerinde yaşamaktadır. Bu bitkinin tohumları suda, toprakta veya başka bir ortamda çimlenememektedir. Tohumlar kuşlar aracılığı ile diğer ağaçlara bulaşmakta ve bitki bu şekilde yaşamını nesiller boyunca sürdürmektedir (Argun ve Şahin, 2006). Bu bitkinin tohumlarından izole edilen embriyolar uygun besi ortamında kültüre alındığında konukçuya gerek kalmadan tohumlar çimlenebilmektedir.

Orkide bitkisinde ise yumrular endosperm içermediğinden doğada çimlenebilmek için bazı funguslara ihtiyaç duymaktadırlar, ancak uygun besi ortamında embriyo kültürüne alındıklarında kolaylıkla çimlenebildikleri bildirilmektedir (Çağlayan ve ark., 1998). Bu araştırmacılar çalışmalarında 6 farklı orkide türünde (*Orchis anatolica*, *B. orchih coriopra L.*, *Ophrys bornmuelleri S.*, *Ophrys phrigma F. B.*, *Serapias vomeraceae*, *Himantoglossum affine*) uyguladıkları embriyo kültürü sonrasında *Orchis* ve *Opyrus* cinsine ait salep orkidelerinin embriyo kültürü ile çoğaltılabileceğini, ancak *Himantoglossum* cinsine ait orkidelerin kullanılan 14 ortamın hiç birinde çimlenme göstermediğini bildirmişlerdir.

2.3. Yaşam Çemberinin Kısaltılmasında Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Bazı türlerin **i)** tohumlarının endospermünde bazı engelleyicilerin olması, **ii)** çimlenme için özel ışık ve sıcaklıklara gereksinim duyulması, **iii)** embriyonun tam olarak olgunlaşmamış olması veya **iv)** sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenme gecikebilmektedir. Bu türlerde embriyo kültürü tekniği uygulanarak çok kısa sürede çimlenme sağlanmakta ve bu sayede bu türlerin yetiştirme süreçleri kısaltılmaktadır.

Bazı türlerde tohumun olgunlaşmasını beklemeye gerek kalmadan, olgun olmayan embriyoların kültürüyle ıslah süreci kısaltılabilmektedir. Örneğin, İris tohumlarının birkaç yıl süren bir dormansi periyoduna sahip olduğu, ancak embriyo kültürü yoluyla İrisin yaşam çemberinin 2 veya 3 yıldan 1 yıla indirilebileceği bildirilmiştir (Bürün ve Gürel, 2001).

Bu teknik soya ve ayçiçeğinde yaşam çemberinin kısaltılmasında kullanılmaktadır. Örneğin ayçiçeğinde tohumun olgunlaşması yaşam çemberinin (120-150 gün) % 50-60'ını kapsamaktadır. Bhojvani ve Razdan (1996), ayçiçeğinin 10 günlük olgunlaşmamış embriyolarının kültürü ile yaşam çemberinin yarıya (60-75 gün) indirilebileceğini ve 1 yılda 2'den fazla generasyon elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

2.4. Uyuşmazlık Nedeniyle Gelişemeyen Embriyoların Gelişimini Sağlamak Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Türler ve cinsler arası melezlemelerde ve farklı ploidi düzeyindeki bitkilerin melezlenmesinde, uyuşmazlık problemleri sık sık ortaya çıkmaktadır. Bu uyuşmazlık problemlerinin birçok sebebi mevcuttur. Bunların bir kısmı döllenme öncesi ortaya çıkan uyuşmazlık problemleri (**i.** Polenlerin stigma üzerinde çimlenmemesi, **ii.** Polenlerin anormal çimlenmesi, **iii.** Polen tüpünün kısa kalması, bu nedenle de yumurtalığa ulaşamaması, **iv.** Yumurtalığa veya yumurtaya ulaşmadan önce polen tüpünün kaybolması, **v.** Döllenmenin gerçekleşmemesi); bir kısmı ise döllenme gerçekleştiikten sonra ortaya çıkan uyuşmazlık problemleri (**i.** Döllenme gerçekleşir fakat zigot bölünemez, **ii.** Zigot birkaç hücreli embriyo oluşturmak üzere bölünür ve daha ileri gelişme gösteremez veya ölür, **iii.** Endosperm embriyonun gelişimini destekleyecek yapıda değildir ve **iv.** Embriyo gelişmesinde küçük kalır ve olgunlaşamaz) olarak açıklanmıştır (Bajaj, 1990; Kurt, 1995; Uysal ve ark., 2006). Bu uyuşmazlık problemleri embriyo oluşumunu ve embriyo gelişimini tamamiyle engellemekte ve böyle durumlarda somatik melezleme, besi ortamında döllenme, embriyo, tohum taslakları ve ovaryumların kültürü gibi teknikler uygulanabilmektedir (Bajaj, 1990).

Proteince zengin bir yağ bitkisi olan yer fıstığı (*Arachis hypogea*) dünyada yenilebilir yağ üretiminde üçüncü sırada gelmektedir. Diğer birçok kültür bitkilerinde olduğu gibi yer fıstığında da başlıca amaç olan verimi, bunun yanında yağ ve protein içeriğini yükseltmek, hastalık ve zararlılara dayanıklılık ve erkencilik gibi karakterler yönünden geliştirmek için türlerarası melezlemeler yapılmıştır. Ancak türlerarası melezlemelerde uyuşmazlık yada melezlerin yavaş gelişmesi gibi sorunlarla karşılaşmıştır. Örneğin, *Arachis hypogea* x *Arachis villosa* arasında yapılan melezlemelerde embriyo kültürü tekniğinden yararlanılmış ve % 2.4-7.6 arasında değişen oranlarda *A. hypogea* türüne benzer triploid ($2n=3x=30$) bitkiler elde edilmiştir (Bajaj ve ark., 1982).

Fasulyede ise bakteriyel hastalıklara (*Pseudomonas phaseolicola*, *Xanthomonas phaseoli*), ve kök çürüklüğüne (*Fusarium solani*) karşı yetersiz olan dayanıklılığı artırmak için bu hastalık etmenlerine karşı dayanıklılık genlerini taşıyan *P. acutifolius* ile melezlemeler yapılmıştır (Bajaj, 1990). Türlerarası melezlerde yaygın olan uyuşmazlık probleminin aşmak için *P. vulgaris* x *P. acutifolius* arasında yapılan melezlerden primitif embriyolar alınarak, sıvı besi ortamında, membran filtre kağıdı üzerinde kültüre alındıktan sonra bitki elde edilmiştir.

Vigna radiata sarı mozaik virüsüne karşı oldukça hassastır ve aynı zamanda da baklalarında çatlama olayı görülmektedir. Aynı zamanda tohumları büyük ve sindirilebilir

protein oranı yüksektir. Aynı cinse ait farklı bir tür olan *Vigna mungo*'da ise sarı mozaik virüsüne dayanıklılık mevcuttur ve aynı zamanda da bakla çatlamasına karşı dayanıklıdır. *V. mungo* ana ebeveyn olarak alındığında, *V. radiata* ile kolaylıkla melezlenebilmekte, ancak resiprokal melezlemeler başarısız olmaktadır. Gosal ve Bajaj (1983), melez embriyoları hormon içeren besi ortamında kültüre aldıklarında % 63 oranında melez bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Nohut (*Cicer arietinum*) yeşil küfe karşı dayanıklı değildir. Nohuta *Cicer pinnatifidum*'dan yeşil küfe karşı dayanıklılık özelliğinin aktarılması amacıyla yapılan türlerarası melezlemede 58 bakladan 44 olgun tohum elde edildiği ve 6 adet yaşama kabiliyetinde bitki geliştirildiği bildirilmiştir (Mallikarjuna, 1999).

Bauchan (1987), *Medicago sativa* türüne ait çeşitlerde önemli zararlara yol açan bazı zararlıların, kendine döllek ve tek yıllık yoncalardan olan *M. scutellata* türünde gövde ve yapraklarındaki tüyler dolayısıyla zarara yol açmadığını, bu özelliğin *M. sativa*'ya aktarılması çalışmalarında uyumsuzluk dolayısıyla embriyo ölümlerinin gözlemlendiğini bildirmiştir. Araştırmacı, yapmış olduğu embriyo kültürü sonrası türlerarası melezlemede gözlenen bu uyumsuzluk engelini aştığını bildirmiştir.

Kültür bitkilerinde yapılan türlerarası melezlemeler baklagil bitkileri ile sınırlı değildir. Bajaj ve ark. (1986), yağlık *Brassica*'larda yapmış oldukları çalışmada *Brassica napus* x *Brassica juncea* melezlemesinde yumurtalık, yumurta ve embriyo kültürlerinden yararlandıklarını, besi ortamına alınan yumurtalıklardan % 37.8 - % 80, yumurtalardan % 30.4 - % 49.5 ve embriyolardan ise % 54.2 - % 88.1 oranlarında başarı düzeyinde bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Pamuk tohumlarının gıda sanayisinde kullanım alanlarını arttırmak için gossypollu bitki ve gossypolsuz tohum özelliğinin kültür pamuğuna (*Gossypium hirsutum* 2n=4x=52) aktarılması çalışmaları yapılmaktadır. Bu özelliği kültür pamuğuna aktarmak için *Gossypium sturtianum* (2n=2x=26) pamuk türü kullanılmaktadır. Fakat pamukta türlerarası gen aktarımını engelleyen; hibritlerde steriliteye yol açan ve melezlemeyi zorlaştıran ploidi seviyeleri, genomlar arasındaki DNA dizilişlerinin farklılığı, endosperm gelişiminin durması, hibritlerin ölmesi ve türlerarası melezlerde sterilite sorunun ortaya çıkması gibi faktörler mevcuttur. (Başal, 2002). Bu sorunları aşmak için türlerarası melezlemeler sonrası embriyo kültürü ve kolhisin uygulaması ile kromozom katlaması yapılarak sağlıklı döllere elde edilebilmektedir.

Gossypium hirsutum'un lifleri uzun ve lif kalitesi iyi, *Fusarium* gibi hastalıklara dayanıklıdır. Bu türün çeşitli stres faktörlerine ve böceklere karşı dayanıklılığını arttırmak için *G. arboreum* ile melezlenmiştir (Gill ve Bajaj, 1987). Bu iki tür melezlendiğinde embriyonun düşmesi, embriyo endosperm uyumsuzluğu gibi problemler ortaya çıkmakla beraber, melezler tozlanmadan sonraki günlerde embriyo kültürüne alındıklarında bu

embriyolardan bu iki türün ortak özelliklerini ihtiva eden varyasyonlara sahip melez bitkiler geliştirilmiştir.

Moraes-Fernandes ve ark. (2000), *Hordeum jubatum* x *Secale cereale* melezlemesinde, melez tohumların döllenmeden 13-16 gün sonra tahrip olduklarını gözlemlemişler ve elde ettikleri bu melezde yaptıkları histolojik çalışmalarla melez embriyoların önemli ölçüde büyümelerine rağmen bunların endosperm uyumsuzluğu yüzünden vaktinden evvel gelişmelerini durdurduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca tozlanmadan 9-12 gün sonra alınan embriyoların besi ortamında kültüre aldıklarını ve kültüre alınan 81 embriyodan bir fide elde ettiklerini bildirmişlerdir.

2.5. Erken Olgunlaşan Sert Çekirdekli Meyvelerde Zayıf Embriyo Gelişimini Önlemek Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Şeftali, kiraz, kayısı ve erik gibi erken olgunlaşan sert çekirdekli meyvelerde yapılan türlerarası melezlemelerde embriyoya su ve besin maddesi taşınması embriyo tam olarak olgunlaşmadan kesintiye uğramaktadır. Erken olgunlaşan bu tip meyvelerden, embriyo olgunlaşmadığı için melez bitki elde edilememektedir (Hatipoğlu, 2001). Melez bitki elde etmek amacıyla embriyo kültür tekniğinin kullanılması kaçınılmaz olmaktadır.

Başka bir meyve türü olan çekirdeksiz üzüm çeşitlerinde embriyo kültürü yoluyla çoğaltılma olanakları araştırılmıştır (Tangolar ve ark., 1998). Araştırmacılar bu tekniğin çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini ve *Vitis* türlerinin erken olgunlaşan çeşitlerinde yapıldığını bildirmişlerdir.

2.6. Haploid Bitkilerin Elde Edilmesinde Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Akrabalık derecesi zayıf olan türlerarası veya cinsler arası melezlemelerde döllenmeden sonra oluşan melez tohumda ebeveynlerden birine ait kromozomların eliminasyonu sonucu haploid bitkiler oluşmaktadır (Hatipoğlu; 2001; Bürün ve Gürel; 2001). Bu teknik özellikle buğday ve arpada başarı ile uygulanmaktadır.

Young ve ark. (1981), türlerarası melezlerde tohum tutma oranının çok düşük olduğunu bildirdikleri çalışmalarında, embriyonun ilk gelişiminden olgun tohum oluşumuna kadar geçen süreyi azaltmak ve türlerarası melez elde etmek amacıyla; olgunlaşmamış embriyoların kültürünü yaptıkları çalışmalarında, *Hordeum vulgare* ve *H. bulbosum* arasında yapmış oldukları melezlemede döllenmiş yumurtadan embriyo gelişirken, *H. bulbosum*

kromozomlarının hızla elimine olduğunu; bu embriyoları kültüre alarak haploid *H. vulgare* bitkisi elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bürün ve Gürel (2001), *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* melezlemesinde döllenmenin gerçekleştiğini, fakat *H. bulbosum* kromozomlarının embriyogenesisin ilk birkaç bölünmesi süresince kaybolduğunu bildirmektedirler. Bu nedenle de gelişen bitkiler haploid *vulgare* bitkileridir. Bu bitkilerin kromozom sayılarının çeşitli muamelelerle iki katına çıkarılması neticesinde double-haploid bitkiler elde edilmektedir. Aynı araştırmacılar, aynı teknikle buğday x mısır ve buğday x sorgum melezlerinden haploid buğdayların, yulaf x mısır melezlerinden de haploid yulaf bitkilerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

2.7. Embriyo Gelişim Mekanizmasını İncelemek Amacıyla Embriyo Kültürünün Kullanımına İlişkin Genel Bilgiler

Embriyo kültür tekniği embriyo gelişimi için gerekli koşullar; bitkisel hormonlar ve çevre koşullarının embriyo gelişmesine etkisi ve embriyonun beslenmesi gibi konuların incelenmesi amacıyla da uygulanmaktadır. Zigotik embriyoların kültürü sayesinde tohum taslağında embriyonun büyümesi esnasındaki koşullar belirlenebilmektedir.

Embriyogenesis genç zigotik embriyolar, somatik embriyolar ve gametik embriyolar kültüre alınarak belirlenmektedir (Pretova ve Obert, 2003). Kültür ortamına ilave edilen oksin ve stokinin gibi hormonlar büyümeyi teşvik etmekte ve bitkicik gelişimi için bir ön muamele oluştururlar. Araştırmacılar ayrıca embriyo gelişiminde % 20 - % 25 süt olumu aşamasındaki embriyoların, % 60 - % 65 kalp şeklindeki embriyoların ve % 85 - % 90 daha ileri aşamadaki embriyoların kültürde gelişimlerini tamamlayarak çimlenmeye hazır duruma geçtiğini, glutamin ilavesinin ketende embriyo gelişimi için önemli bir ön işlem olduğunu bildirmişlerdir.

Ciamprova ve Pretova (1981) ise, embriyonun gelişimi sırasında plastidlerin yapısındaki değişimi incelemişlerdir. Bu çalışmada tozlanmadan sonra 14 günlük embriyoları kültüre aldıklarında bu embriyoların yeşil olduklarını ve embriyoların temel dokusu içerisindeki nişasta granülleri ve phytoferritin bileşimi bakımından iyi geliştiğini, süt olum dönemi boyunca plastidlerin büyüklüğünün azaldığını, kloroplastların iç yapısının giderek dağıldığını, 10 günlük kültür sonrası 24 günlük embriyoların yeşil renklerini kaybederek sarardıklarını ve stomaların farklı büyüklüklerde olduğunu, 20 günlük kültür sonrası 34 günlük embriyoların ise yeniden yeşil renklerini alarak asimilasyona ve çimlenmeye başladıklarını bildirmişlerdir.

2.8. Embriyo Kültüründe Kullanılan Besi Ortamlarına İlişkin Genel Bilgiler

Pretova (1986), döllenmeden 3-6 gün sonra keten (*Linum usitatissimum* L.) embriyolarını % 12 sucrose ve % 0.8 agar içeren Monnier (1978) ortamında ve bu ortama 5×10^{-4} , 5×10^{-6} , 5×10^{-8} mol/l oranlarında kinetin ilave edilmiş ortamlarda kültüre aldığını, kinetin içermeyen ortamda tüm embriyoların gelişim gösterebilmesine rağmen gelişmelerini tamamlayamadığını, ele alınan ortamlar içerisinde embriyo gelişimi açısından en iyi sonucun 5×10^{-8} mol/l kinetin içeren Monnier ortamından sağlandığını bildirmiştir.

Pretova ve Willims (1986), keten embriyolarını % 5 şeker içeren Monnier ortamında ve bu ortama, $\pm 0,4$ g/l glutamin, $\pm 1,0$ g/l yaprak ekstraktı, $\pm 0,05$ g/l BAP oranlarında hormonların ayrı ayrı ve birlikte ilave edildiği ortamlarda kültüre aldıklarında; a) hormon içermeyen yalın ortamın normal embriyo gelişimini sağladığını, b) yalnız yaprak ekstraktı ilavesi kök ekseninin büyümesini önlediğini, c) yalnız BAP ilavesinin sürgün oluşumunu ve sürgün gelişimini teşvik ettiğini, kotiledon ve hipokotil dokularında kallus oluşumuna sebebiyet verdiğini, d) üç hormonun (glutamin, BAP, yaprak ekstraktı) birlikte ilave edilmesi durumunda kuvvetli bir embriyogenik gelişmenin sağlandığını ve kök uçlarında büyümenin teşvik edildiğini, e) glutaminin bulunmadığı ortamlarda embriyoların pek azının yeşil renk gösterdiğini, f) BAP içeren ortamlarda embriyoların yeşil rengini aldığını, BAP içermeyen ortamlarda ise kültür süresi boyunca embriyoların yeşil rengini kaybederek solduğunu bildirmişlerdir.

Karaca ve Bürün (1999), 88 buğday genotipinden izole edilen olgun ve olgun olmayan embriyoları 2,4-D, kinetin, NAA ve asparajin ilave edilmiş MS ortamında kallus oluşumunu incelemek amacıyla yaptıkları araştırma sonucu olgunlaşmamış embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumunun ortalama % 94 ile 2 mg/lt 2,4-D + 1 mg/lt kinetin ilave edilmiş MS ortamından elde edildiğini, olgun embriyoların kültüründe ise en yüksek kallus oluşumunun ortalama % 95 ile 2 mg/lt 2,4-D ilave edilmiş MS ortamından elde edildiği saptamışlardır.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002), arpa (*Hordeum vulgare* L.)' da olgun embriyoları kültüre alarak besi ortamının etkisini araştırmışlardır. Kullanılan besi ortamları içerisinde embriyodan bitkicik gelişimi en yüksek Randolp-Cox ortamında (% 92.1) elde edilmiş, bunu sırasıyla MS (% 91.3), $\frac{1}{2}$ MS (% 87.7) ve B5 ortamları izlediğini tespit etmişlerdir.

Walker ve Sato (1981), besi ortamının bileşimindeki amonyum iyonlarının in vitro'da kritik bir etkiye sahip olduğunu, somatik embriyo üretimi için minimum 12.5 mM NH_4^+ iyonuna ihtiyaç duyulurken, kök teşekkülünün 50 mM ve üzerindeki dozlarda engellendiğini ve sürgünlerin NH_4^+ bulunmayan ortamlara aktarılmaları durumunda kök gelişiminin başladığını, bu nedenle in vitro gelişimin seyri üzerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başlarına değil NH_4^+ ile birlikte bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bauchan (1987), döllenenmeden sonraki günlerde, *Medicago sativa* ve *M. scutellata* türlerine ait küresel, kalp ve torpedo, dönemlerindeki embriyoları izole ederek, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, IAA, BAP ve Kinetin içeren MS ile L-glutamin ve L-prolin içeren SH ortamlarında kültüre almıştır. Araştırma sonucu; *M. scutellata* türüne ait kalp ve torpedo dönemlerindeki embriyoların 0.05 mg/l IAA ve BAP içeren MS ortamında 15-30 gün içerisinde bitkiye dönüştüklerini, *M. sativa* türünde ise en yüksek tepkimenin 50 mM L-glutamin ilave edilmiş SH ortamında sağlandığını ve hem sürgün hem de kök gelişiminin aynı ortamda gerçekleştiğini tespit etmiştir.

Meijer ve Brown (1987), yonca *in vitro* kültüründe indüksiyon ortamında embriyo teşekkülü için 5 mM amonyumun mutlak gerekli olduğunu, 10-20 mM düzeyinde amonyumun ise embriyoların sürgüne dönüşümünde optimum doz olarak gözlemlendiğini, ortamdaki amino asitlerin ise embriyo-sürgün dönüşümünde olumsuz etki gösterebildiğini, ancak 1-2 mg l⁻¹ casein hidrolizat veya 4.4 mM glutamin ve 3.1 mM prolin kombinasyonlarının olumsuz etkilerinin olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılar düşük yada yüksek şeker konsantrasyonlarının somatik embriyogenesisi engelleyici etkisinin olduğunu, bu nedenle de doku kültürü çalışmalarında genelde % 3 sakkaroz konsantrasyonunun kullanıldığını bildirmişlerdir.

2.9. Embriyo Kültüründe Genotipin Etkisine İlişkin Genel Bilgiler

Genotip sadece embriyo kültür tekniğinde değil doku kültürü çalışmalarında da başarıyı etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Birsin ve ark. (2001), yulaf kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneğini belirlemek amacıyla 10 yulaf çeşit yada hattını kullandıkları çalışmalarında kallus oluşturmada olgun embriyolardan yararlanmışlardır. Elde ettikleri verileri istatistiki olarak değerlendirdiklerinde kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin çeşit ve hatlara göre değiştiğini, çalışmada kullanılan iki yulaf çeşidi % 72.5 ve % 77.5 oranlarında kallus oluştururken, kullanılan 8 yulaf hattında bu oranın % 50 ile % 85 arasında değiştiğini saptamışlardır. Ayrıca kallus oluşumu ve rejenerasyon arasında önemli bir ilişkinin olmadığını; rejenere bitki sayısının doğrudan kallus oluşumuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Kallus ve somatik embriyo üretim kapasiteleri açısından farklı yonca türlerine ait 76 genotipin kıyaslandığı bir araştırma sonucu; stolonlu kök yapısına sahip yonca türlerinden *Medicago falcata*'ya ait genotiplerin bu özellikler bakımından diğer türlere kıyasla daha üstün performans gösterdiği, yüksek embriyogenik kapasiteli genotiplerde bitkiye dönüşüm oranının da yüksek olduğu saptanmıştır (Brown ve Atanassov, 1985).

Farklı pamuk türlerine (*Gossypium arboreum* ve *G. hirsutum*) ait zigotik embriyo hücrelerinin MS besi ortamında kültüre alındığı bir araştırmada; *G. arboreum*'a ait kültüre alınan yumurta hücrelerinden % 17.6 başarı düzeyinde çimlenme elde edilmesine karşılık, *G. hirsutum*'a ait yumurta hücrelerinden sadece % 8.3 başarı düzeyinde çimlenme elde edilmiştir (Gill ve Bajaj, 1987).

2.10. Embriyo Kültüründe Kullanılan Sterilizasyon Yöntemi ile İlgili Genel Bilgiler

Sterilizasyon sadece embriyo kültürü çalışmalarında değil, bütün doku kültürü çalışmalarında başarıyı doğrudan etkilemektedir. Sterilizasyon yanında, sterilizasyonda kullanılan kimyasallar ve uygulanma şekilleri de önem kazanmaktadır.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002), arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nin olgun embriyolarının kültüründe sterilizasyon yönteminin etkisini araştırdıkları çalışmalarında; farklı sterilizasyon yöntemi; **(i)** tohumları önce su altında durulama, ardından 2-3 dakika deterjanlı su ile muamele edip, 3-4 kez steril su ile yıkadıktan sonra % 70'lik etanolde 2 dakika bekletme ve daha sonra 1 damla Tween-20 damlatılmış % 2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika muameleden sonra 5-6 kez steril su ile yıkama, **(ii)** tohumları önce % 70'lik etanole daldırma, daha sonra % 2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 15 dakika muamele edip, 5-6 kez steril su ile yıkama ve arkasından 30 dakika antibiyotik solüsyonunda (600 mg/l penicilin + 250 mg/l streptomycin) durulama, **(iii)** tohumları 10 dakika 1 damla % 0.5'lik HCl ilave edilmiş % 0.1'lik HgCl₂ solüsyonunda bekletme, daha sonra % 6'lik hidrojen peroxide (H₂O₂)'e daldırma ve 3-4 kez steril su ile yıkama, **(iv)** tohumları önce % 70'lik etanolle muamele edip, ardından % 4.5'lik sodyum hipokloritle 5 dakika muameleden sonra 4-5 kez steril su ile yıkama) kullanılmış, kullanılan sterilizasyon yöntemleri içinde embriyodan bitkicik gelişimi bakımından, sodyum hipoklorit ile sterilizasyonu antibiyotik çözeltisi ile muamele etme (*sterilizasyon i*) ve HgCl₂ ile yapılan sterilizasyonun (*sterilizasyon ii*) daha etkili olduğunu, ancak HgCl₂'ün embriyodan bitkicik gelişimi üzerine istatistikî bakımdan önemli olmayan etkisinin de gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

2.11. Türlerarası Melezlemeye İlişkin Genel Bilgiler

Türler ve cinsler arası melezlemelerde ve farklı ploidi düzeyindeki bitkilerin melezlenmesinde, uyumsuzluk problemleri sık sık ortaya çıkmaktadır. Bu uyumsuzluk problemleri; döllenme öncesi ortaya çıkan uyumsuzluk problemleri **(i)**. Polenlerin stigma üzerinde çimlenmemesi, **(ii)**. Polenlerin anormal çimlenmesi, **(iii)**. Polen tüpünün kısa kalması, bu nedenle de yumurtalığa ulaşamaması, **(iv)**. Yumurtalığa veya yumurtaya ulaşmadan önce

polen tüpünün kaybolması, v. Döllenmenin gerçekleşmemesi) ve döllenme gerçekleşikten sonra ortaya çıkan uyumsuzluk problemleri (i. Döllenme gerçekleşir fakat zigot bölünemez, ii. Zigot birkaç hücreli embriyo oluşturmak üzere bölünür ve daha ileri gelişme gösteremez veya ölür, iii. Endosperm embriyonun gelişimini destekleyecek yapıda değildir ve iv. Embriyo gelişmesinde küçük kalır ve olgunlaşamaz) olarak sıralanabilir. Bu uyumsuzluk problemleri embriyo kültürü ile aşılabilmektedir (Bajaj, 1990). Bu amaca yönelik olarak yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Diederichsen ve ark. (1996), *B. campestris* ve *B. oleracea*'dan elde ettikleri *P. brassicae*'ya karşı olan dayanıklılığı, yeniden sentezlenmiş olan kolza hatlarına aktarmışlardır. Türlerarası melezlemeden elde edilen döllerin çeşitli *P. brassicae* izolatlarına karşı güçlü bir dayanıklılık gösterdiğini saptamışlardır. Kök ur hastalığına dayanıklı hatların ve bir geriye melezleme generasyonunun geliştirilmesini içine alan bir ıslah programında bu hatlar orijinal olarak *B. campestris*'den gelen 3 dominant dayanıklılık genini ihtiva etmekteydi. Yaptıkları çalışmalarda geriye melezlenen bitkilerin çeliklerinin farklı *P. brassicae* izolatları ile farklı şekilde interaksiyona girdiğini tespit etmişlerdir.

Brassica napus x *Brassica juncea* melezlemesinde embriyo kültürü ile besi ortamına alınan embriyolardan % 54,2 - % 88,1 oranında bitki elde edilmiştir (Bajaj ve ark., 1986).

Yer fıstığı (*Arachis hypogea*) dünyada yenilebilir yağ üretiminde üçüncü sırada gelmektedir. Yer fıstığında verimi artırmak, yağ ve protein içeriğini yükseltmek, hastalık ve zararlılara dayanıklılığı artırmak ve erkencilik için türlerarası melezlemeler yapılmıştır. Ancak türler arası melezlemelerde birçok sorun ile karşılaşmıştır. Bu sorunlar embriyo kültür tekniği kullanılarak aşılmış olup, *Arachis hypogea* x *Arachis villosa* arasında yapılan melezlemelerden % 2,4-7,6 arasında değişen oranlarda *A. hypogea* türüne benzer triploid ($2n=3x=30$) bitkiler elde edilmiştir (Bajaj ve ark., 1982).

Fasulyede bakteriyel hastalıklara (*Pseudomonas phaseolicola*, *Xanthomonas phaseoli*) ve kök çürüklüğüne (*Fusarium solani*) karşı dayanıklılığı artırmak için *P. vulgaris* x *P. acutifolius* arasında yapılan melezlerde karşılaşılan uyumsuzluk problemi oluşan primitif embriyolar, besi ortamında embriyo kültürü yapılarak aşılmıştır (Bajaj, 1990).

Vigna radiata'nın tohumları büyük ve sindirilebilir protein oranı yüksek olup, sarı mozaik virüsüne karşı hassas ve baklalarında çatlama olayı görülmektedir. *Vigna mungo* ise sarı mozaik virüsüne ve bakla çatlmasına karşı dayanıklıdır. *V. mungo* ana ebeveyn olarak alındığında, *V. radiata* ile kolaylıkla mezlelenebilmekte, ancak resiprokal melezlemeler başarısız olmaktadır. Yapılan resiprokal melezlemelerden oluşan F1 melez embriyolar, besi ortamında kültüre alındığında % 63 oranında melez bitkiler elde edilmiştir (Gosal ve Bajaj, 1983).

Cicer arietinum'a, yeşil küfe karşı dayanıklılık kazandırmak amacıyla *C. pinnatifidum* ile yapılan türlerarası melezlemelerde oluşan F1 dölleri, besi ortamında embriyo kültürüne alındığında, oluşan bitkilerden 44 olgun tohum elde edilmiştir (Mallikarjuna, 1999).

Medicago sativa'da zarar yapan bazı zararlıların, *M. scutellata* türünde bulunan gövde ve yapraklardaki tüyler nedeniyle zarar yapamadığı tespit edilmiştir. *Medicago sativa* ve *M. scutellata* arasında yapılan melezlemelerde ortaya çıkan uyumsuzluk problemi, besi ortamında embriyo kültürü yapılarak aşılmıştır (Bauchan, 1987).

Pamuk tohumlarının gıda sanayisinde kullanım alanlarını arttırmak için *Gossypium sturtianum* ($2n=2x=26$)'dan gossypollu bitki ve gossypolsuz tohum özelliğinin kültür pamuğuna (*Gossypium hirsutum* $2n=4x=52$) aktarılacak amacıyla yapılan türlerarası melezlemelerde sterilite sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu sorun *Gossypium sturtianum* ile *Gossypium hirsutum* arasında yapılan melezlemeler sonrasında oluşan primitif embriyoların, besi ortamında kültüre alınması ve oluşan bitkilerin kromozomlarının kolchisin ile katlanması ile aşılmıştır (Başal, 2002).

Gossypium hirsutum'un stres faktörlerine ve böceklere karşı dayanıklılığını artırmak için *G. arboreum* ile yapılan melezlemelerde ortaya çıkan embriyo ölümleri, embriyo-endosperm uyumsuzluğu gibi problemler, embriyo kültürü ile aşılmıştır (Bajaj, 1990).

Hordeum jubatum x *Secale cereale* melezlemesinde, melez embriyoların önemli ölçüde büyümelerine rağmen bunların endosperm uyumsuzluğu nedeniyle vaktinden evvel gelişmelerini durdurduklarını tespit etmiştir. Bu problem, oluşan primitif embriyoların besi ortamında kültüre alınması ile kısmen ortadan kaldırılmış ve besi ortamına alınan toplam 81 embriyodan sağlıklı bir fide elde edilmiştir (Moraes-Fernandes ve diğ., 2000).

2.12. Lahana Kök Uru Hastalığının Özelliklerine İlişkin Genel Bilgiler

Plasmodiophora brassicae sporları 2-4 mini mikron çapında, yuvarlak, renksiz ve kalın zarlıdır. Kısa bir dinlenme periyodundan sonra sporlar uygun toprak PH'sında (genel olarak 4-6), konukçunun kök salgıları sonucu çimlenir, iki kamçılı zoospor meydana gelir. Zoospor, kök emici tüylerinden enfeksiyon yapar ve 7-8 günde kök içinde plasmodium haline geçer. Bundan meydana gelen olgun zoosporangia'dan sekonder zoosporlar tekrar toprağa dağılır. Sekonder zoosporların enfeksiyon yapıp, yapmadığı henüz aydınlığa kavuşmamıştır. Plasmodium kök ve kök boğazı hücreleri içini kaplar ve burada onların dev hücreler haline almasına neden olur. Çekirdeği pek çok bölünerek içini dolduran binlerce yuvarlak dinlenme sporu meydana gelir. Köklerin çürümesi sonucu sporlar çimlenmeden itibaren 7-8 yıl toprakta canlılıklarını koruyabilirler (Anonymous, 2014).

Chiang ve Crete (1976), beyaz baş lahanada kök-uru hastalığının (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) 6 nolu ırkına karşı dayanıklılığın kalıtımını belirlemek için yaptıkları araştırma sonucu hastalığın kalıtımında; eklemeli gen etkisinin daha önemli olduğunu ve dar anlamada kalıtım derecesinin % 83 olduğunu belirlemişlerdir.

Maizin (1976), ekolojik açıdan hareketsiz sporların (kistler) 3 yıldan fazla toprakta canlı kaldığını, çimlenme ve bitki enfeksiyonu için toprak nemi % 60-90, hastalık enfeksiyonu için pH 5.4-6,5 olmasının en uygun olduğu, asidik topraklarda bitkilerin enfeksiyonu için minimum sıcaklık değişimleri 10-12°C, maksimum 30-35°C ve optimum 20-25°C olduğunu rapor etmiştir.

Yoshikawa (1983), hastalığa dayanıklılığın monogenik dominant kalıtıma sahip olduğunu rapor etmesine karşılık, Suwabe ve diğ. (2000), hastalığa dayanıklılığın oligogenic yapıda olduğunu rapor etmektedirler.

Scholze ve diğ., (2002), ise kök-uru hastalığına karşı dayanıklılığın *Brassica* türlerinde, dominant monogenik (*Brassica campestris* ve *B. napus*'ta olduğu gibi) ile oligogenik resesif (*B. oleracea*'larda olduğu gibi) kalıtıma sahip olduğunu bildirmektedirler.

Grandclement ve diğ., (1996), yaprak lahana ve karnabahar hatlarında kök-uru hastalığına (*Plasmodiophora brassicae*) karşı dayanıklılığın mekanizmasını, kombinasyon yeteneği çalışmaları yaparak belirlemişlerdir. Yapılan genel kombinasyon yeteneği testinde, dayanıklılığın kalıtımında eklemeli gen etkisinin baskın olduğunu, bazı yaprak lahana hatlarının fazla dayanıklı, bazılarının ise orta derecede dayanıklı olduklarını, karnabahar hatlarının ise hassas oldukları belirlenmişlerdir.

Trembly ve diğ., (1999), eski Avrupa'da 13. yüzyıla kadar kök-uru hastalığının varlığının rapor edildiğini ve 19. yüzyılın sonlarında, St. Petersburg'da kök-uru hastalığı ciddi bir salgın halinde lahana mahsulünde büyük oranlarda tahribat yaptığını bildirmişlerdir.

Kobelt ve diğ., (2005), *P. brassicae*'ya karşı 3 dayanıklı ve 1 hassas *A. thaliana* L. Heynh. (tere) ekotipinin dayanıklılık mekanizmasını mikroskobik olarak inceledikleri araştırmada; *P. brassicae*'nin "eH" izolatına dayanıklı ekotiplerin bulunduğunu ve bu dayanıklılığın dominant ve monogenic kalıtıma sahip olduğunu, dayanıklı bulunan ekotiplerin, dayanıklı olmasının sebeplerinden birisinin bu ekotiplerin hücrelerinde meydana gelen ligninleşme ve bu ligninleşmenin de fungusun yayılmasını önlemesi, diğer bir sebep olarak da tanin benzeri maddelerin patojenin parçalanmasına neden olabileceği varsayımı ortaya koymasındır.

Dixon (2006), ekolojik çalışmaların organizmanın akrabalık ilişkilerini, biyotik ve abiyotik etkileşimini geliştirdiğini, toprakta bulunan diğer mikropların konukçu üzerindeki *P. brassicae*'nin etkisini azalttığı, kalsiyum, brom, nitrojen ve bazık pH değerlerinin benzer yönde etkiye sahip olduğunu bildirmiştir.

Apaydın ve diğ., (2010), Avrupa Irk Ayrım Seti ve konukçu olarak kolza bitkisini kullanılarak yaptıkları araştırma sonucu Karadeniz Bölgesinde ECD 16/31/31 ırkının ve patotip 1'in olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar lahana kök-uru hastalığının Türkiye'de yaygın olarak Ordu, İstanbul ve İzmir'de gözlemlendiğini, son yıllarda ise Giresun ve Trabzon illerinde bu hastalığa rastlandığı rapor etmişlerdir.

2.13. Lahana Kök Uru Hastalık Etmeninin İzolasyonu ve Muhafazasına İlişkin Genel Bilgiler

Williams (1966), *P. brassicae*'nin dinlenme sporlarını kök urlu köklerden izole etmeyi başarmıştır. Bu amaçla; urlu köklerin 3 kat hacimli suda 3 dakika süre ile tutulduktan sonra blenderden geçirip, bir tülbent yardımıyla filtre edilip, santrifüje tabi tutularak elde edilen spor peltesini tekrar sulandırıp, konukçu fidelerinin dikildiği toprağa karıştırmıştır.

Topraktan hastalık etmeninin seyreltme tekniği ile izole edilebileceği (Fox, 1993), steril petri kabı içerisinde küçük bir toprak parçası su ile karıştırılarak eritilmiş agarla karıştırılarak süspansiyon hazırlanabileceği (Warcup, 1950), sodyum carboxymethyl selüloz (CMC) veya % 0.2 agarlı su ile yeterli akışkanlıkta seyreltilebileceği (Hornby ve Ullstrup, 1967) bildirilmiştir.

Gerrick ve Duffus (1988), 7.5 cm'lik toprak saksıların ¼'ünü yıkanmış kum ile doldurup, her bir saksının içine enfekteli bitkilerin köklerinden 50 mg koyup, uygun konukçunun tohumlarını saksıya ekip, saksıları 16-20 °C'de her gün sulayarak, inkübasyona bıraktıklarında; hastalık sporlarının, ekilen lahana köklerinin üzerinde, 35 gün sonra gelişme gösterdiğini, köklerin toprak veya kumdan arındırılarak havada kurutulması durumunda, oda sıcaklığında hastalık sporlarının, yıllarca, köklerde canlı kalabileceğini tespit etmişlerdir.

Campell (1988), *P. brassicae* fungusunun izolatlarını muhafaza etmek için temel prosedürün; bu izolatları kum kültüründe yetiştirilen hassas bir konukçu üzerinde 16-20 °C'de muhafaza etmek olduğunu bildirmekte, fakat başka mikroorganizmalar tarafından köklerin enfeksiyona uğramaması gerektiğini ifade etmektedir. Diğer mikroorganizma enfeksiyonlarının önlenmesi için kum kültürüne 25 gr/ml PCNB ve 5 gr/ml Metalaxyl ihtiva eden bir solüsyonun, haftada bir, tatbik edilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

Sönmez (2005), hastalık etmenine sahip bitki köklerinin çürüme sonucu sporların toprağa yayıldığını, konukçu olmadığı takdirde sporların çimlenmeden toprakta 7-8 yıl canlılıklarını koruyabildiklerini, toprak pH'sının takriben 4-6 olması durumunda konukçu, kök salgıları sonucu çimlenip, kök emici tüylerinden enfeksiyon yaparak yayıldığını ve bu şekildeki bulaşık topraklardan hiç ürün alınmadığını rapor etmiştir.

Xue ve diğ., (2008), *Plasmodiophora brassicae* tekli sporlarının 8 haftada ur oluşan bitki köklerinden izole edildiğini, *Pasmodiophora brassicae* tekli sporları aşılama yapılmasında distile su ile $1 \times 10^{+7}$ spores/ml inkübasyona bırakıldığını, bir haftalık çimlenmiş fidelerin 10 saniye daldırma yöntemiyle köklerin inkübasyona bırakıldığını böylece spor aşılmasının bu şekilde yapıldığını bildirmişlerdir.

2.14. Lahana Kök Uru Hastalığının Etkinliğine İlişkin Genel Bilgiler

Wallenhammar ve diğ. (1994), kolza (*Brassica napus* L.) ile yürüttükleri tarla denemelerinde; *P. brassicae*'nin toprağa artan miktarlarda uygulanan inokulum miktarlarıyla verim kaybı arasında çok yakın bir ilişkinin bulunduğunu, hastalık şiddeti ile verim arasındaki ilişkinin $R^2= 0.90$ seviyesinde ve topraktaki inokulum miktarıyla verim arasındaki ilişkinin ise $R^2=0.94$ seviyesinde tespit etmişlerdir. Diederichsen ve diğ., (1996), *B. campestris* ve *B. Oleracea* arasındaki türlerarası melezlemeden elde ettikleri döllerin çeşitli *P. brassicae* izolatlarına karşı güçlü bir dayanıklılık gösterdiğini, kök uru hastalığına dayanıklı hatların ve bir geriye melezleme generasyonunun geliştirilmesini içine alan bir ıslah programında bu hatların orijinal olarak *B. campestris*'den gelen 3 dominant dayanıklılık genini ihtiva ettikleri, geriye melezlenen bitkilerin klonlarının farklı *P. brassicae* izolatları ile farklı şekilde interaksiyona girdiklerini tespit etmişlerdir.

Manzanares ve diğ., (1996), 5 farklı *B. oleraceae* (lahana) genotipinin *P. brassicae*'ya direnç yönünden yaptıkları değerlendirmede; farklı izolatların farklı genotiplerde farklı reaksiyonlar verdiğini saptamışlardır.

Scholze ve Hammer (1998), *B. oleracea* (lahana), *B. rapa* (şalgam), *R. sativus* (turp), *S. albanin* (yabani hardal) kültür formları ve bunların yabani akrabalarını içine alan lahanagiller familyasına ait 900 hattı bazı *P. brassicae* izolatlarına karşı dayanıklılık yönünden değerlendirdikleri araştırma sonucu; *B. oleacea* 'lardan denemeye alınan 489 hattın hastalığa aşırı derecede hassas olmasına karşın bu hatların içindeki bazı tek bitkilerin ve yüksek verimli F1 hibrit bitkilerin dayanıklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Asano ve diğ., (1999), *P. brassicae* sporları ile enfekte ettikleri lahana (*B. oleracea* var. *capitata* cv. Fuji Wase), çin lahanası (*B. pekinensis* cv. Musou Hakusai), şalgam (*B. rapa* var. *rapifera* cv. Wase Okabu) ve kolza (*B. napus* line Dc 119) köklerinde hastalık etmenine karşı hassasiyet yönünden bariz farklılıkların olduğunu, çin lahanası ve şalgam köklerindeki enfeksiyon oranının sırasıyla % 53.3 ve % 80.0 olduğunu, lahana ve kolza köklerinde ise gal oluşunun gözlenmediğini belirlemişlerdir.

Hardal fideleri (*B. juncea*) üzerine inokule edilen *P. brassicae* sporlarının farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı inokülasyon seviyesinde farklı hastalık seviyeleri ortaya

koyduğu; dikimden sonra 18, 27, 34 ve 41 günlük srelerden sonra ulaşılan hastalık indekslerinin sırasıyla 2.04, 2.61, 2.78 ve 2.88 olduğunu, beş farklı inokulum seviyesinde (0.0, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0) elde edilen hastalık indekslerinin sırasıyla 2.79, 2.01, 2.30, 2.62 ve 2.68 olduğunu rapor edilmiştir (Anonymous, 2000).

Cheah ve diğ., (2001), yaptıkları denemelerde; 1) şalgam (*B. rapa* L.) bitkilerini kök-uru fungusuyla şiddetle bulaşık tarlada 70 gün yetiştirdikten sonra yaptıkları gözlemlerde şalgam bitkilerinin köklerinin hastalıkla enfekte olmadığını, sera şartlarında bu şalgam bitkilerinin yaprak ve kökleri 1-5 mm byklğinde parçalara bölünüp, lahana kök-uru fungusu ile bulaşık 250 gr toprak ihtiva eden saksılara karıştırıp, saksılara 14 günlük Wong Box çin lahana çeşidi dikildiğinde yapılan 0-5 skala değerlendirildiğinde; şalgamlı saksılardaki hastalık skalasının 0.6 olmasına karşın kontrollerde 3.4 olduğunu saptamışlardır. 2) Kök-uru fungusuyla enfekteli tarlada m²'de 16 şalgam bitkisini 70 gün süreyle yetiştirdikten sonra toprak sürülerek bitkiler 12 cm toprak derinliğine karıştırmış ve bitki materyalleri 3 hafta süreyle dekompoze olmaya bırakılmıştır. şalgamla muamele edilen toprak alınarak serada saksılara yerleştirilmiştir. 14 günlük çin lahanası fideleri saksılara dikilerek 25 °C'de 5 hafta bekletilmiştir. Sonuçlar 0-5 skalasına göre değerlendirildiğinde; şalgamla muamele edilen saksılardaki lahanalarda hastalık skalası 0.2 olmasına karşın kontrollerde 1.5 olduğu saptanmışlardır. 3) şalgam (*B.rapa* L.) ve kolza (*B. napus* L.) bitkileri kök-uru fungusuyla bulaşık, pH'sı 6.0 olan tarlada 70 gün yetiştirildikten sonra bitkiler sürülerek 12 cm toprak derinliğine karıştırılıp 3-4 haftalık dekompoze süresi sonunda Wong Box çeşidi çin lahanası bu alana dililerek 14 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde şalgam ve kolza parsellerinde hastalık skalasının 0.6-0.8 arasında değerirken kontrollerde 1.4 olduğu tespit edilmişlerdir.

Porth ve diğ., (2003), *P. brassicae*'nin *Cruciferae* familyasına mensup bütün sebzeler (lahana, karnabahar, turp, şalgam ve çin lahanası), kolza ve hardal gibi bitkilerde zarar yapan hastalık etmeni olduğunu ve özellikle lahanagiller üretiminin yoğun olarak yapıldığı Doğu Asya, Kuzey Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da çok önemli ölçüde zarar yaptığını bildirmektedirler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1.Bitki Materyali

Bu araştırmada bitki materyali olarak *Brassica* familyasında yer alan lahana kök-uru hastalığına (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) mukavim 4 şalgam hattı ve lahana kök-uru hastalığına karşı aşırı hassas 1 adet beyazbaş lahana çeşidi (Dürme) kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan bitki materyallerine ait genel bilgiler aşağıda verilmiştir.

1-şalgam (ř1)- *Brassica rapa* var *rapifera* line aaBBCC =ECD-01(İngiltere orijinli)

2-şalgam (ř2)- *Brassica rapa* var *rapifera* line AAbbCC=ECD-02 (İngiltere orijinli)

3-şalgam (ř3)- *Brassica rapa* var *rapifera* line AABBcc =ECD-03(İngiltere orijinli)

4-şalgam (ř4)- *Brassica rapa* var *rapifera* line AABBCC=ECD-04(İngiltere orijinli)

5-Beyazbaş Lahana (D)-*Brassica oleracea* var. *capitata* =Dürme (Türkiye’de tescilli beyaz baş lahana çeşidi).

3.1.2. Lahana Kök Uru Hastalığıının Testlemesinde Kullanılan Tohum Materyali

Melez kombinasyonlarda yapılan embriyo kültürü sonucu elde edilen primitif bitkilerde kromozom katlaması ve vernalizasyon sonrası kendilemeler yapılmış olup, DXECD-04 melez kombinasyonun 8 farklı melez bitkisinden 210 tohum testlemede kullanılmıştır. Kullanılan tohumlara ilşkin veriler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Hasat sonrası elde edilen tohumlar, +4°C’de buzdolabında testleme zamanına kadar tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Hastalık Testlemede Kullanılan Tohum Sayıları ve Ait Oldukları Melez Kombinasyonlara İlişkin Veriler

Melez No	Melez Kombinasyon	Tohum Sayısı
1.Melez	DXECD-04	11
2.Melez	DXECD-04	15
3.Melez	DXECD-04	70
4.Melez	DXECD-04	60
5.Melez	DXECD-04	30
6.Melez	DXECD-04	8
7.Melez	DXECD-04	9
8.Melez	DXECD-04	7
Toplam		210

3.1.3. Toprak Materyali

Araştırmada; Çimlendirme, yetiştirme ve tarla koşulları olmak üzere üç farklı aşamada, farklı nitelikte toprak kullanılmıştır.

3.1.3.1. Ebeveyn Bitkilerin Çimlendirilmesinde Kullanılan Toprak Materyali
Çimlendirme ortamı olarak 1/2 oranında torf ve 1/2 oranında bahçe toprağı karışımından oluşan toprak kullanılmıştır.

3.1.3.2. Yetiştirme Aşamasında kullanılan Toprak Materyali

Bu amaçla, 1/3 oranında torf, 1/3 oranında bahçe toprağı ve 1/3 oranında yanmış ahır gübresi ihtiva eden karışım elekten geçirilerek kullanılmıştır.

3.1.3.3. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirildiği Toprak Materyali

Ebeveyn bitkiler tarla koşullarında yetiştirilmiştir. Bu amaçla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesinin Araştırma-Uygulama alanındaki arazi kullanılmıştır.

3.1.3.4. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Toprak Materyali

Testleme çalışması için toprak materyali *Plasmodiophora brassicae* Wor. hastalık sporlarının çalışabileceği toprak yapısında olması gerekmektedir. Toprak materyali için en önemli faktör toprağın pH'sının hastalık sporlarının çalışmasına izin verecek düzeyde olmasıdır. Bu amaç doğrultusunda literatürlere bakıldığında pH'sı düşük toprak

araştırılmasına gidilmiştir. Araştırma sonucu Ali Nihat Gökyiğit Araştırma İstasyonundan (ANGAI), Toprak pH'sı 6,21 olan toprak kullanılmıştır.

3.1.3.5. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Kum Materyali

Testlemede zoosporların aktivitesini hızlandırmak ve toprağı havalandırmak amacıyla kullanılan ırmak kumu Samsun-Bafra Kızılırmak nehrinden alınmıştır.

3.1.3.6. Kök Uru hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Perlit Materyali

Testlemede kullanılacak ana materyal olan toprağın ağır bünyeli olduğu için toprağın bünyesini düzenlemek amacıyla hazırlanan toprak karışıma perlit ilave edilmiştir.

3.1.4. Besi Ortamı

3.1.4.1. Embriyo Kültür Ortamı

Türlerarası melezlemeden elde edilen primitif embriyoların kültüründe MS5519 (Murashige and Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmıştır.

3.1.4.2.Sürgün Gelişimi Ortamı

Embriyolardan elde edilen bitkiciklerin sürgün gelişiminde 0,1 mg/l IAA (Indole-3-Asetik Asit) ve 0,5 mg/l BAP (Benzil Amino Pürin) ihtiva eden MSD4 besi ortamı kullanılmıştır.

3.1.4.3. Kök Gelişimi Ortamı

Sürgün gelişim ortamında belirli bir büyüklüğe ulaşan bitkiciklerin kök gelişiminde 0,1 mg/l IAA ihtiva eden MSD4 besi ortamı kullanılmıştır.

3.1.4.4. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Besi Ortamı

Testleme yapılacak melez bitkiler steril ortamda yetiştirilmiştir. Bu amaçla sterilize edilen tohumların ekiminde MSD4 besi ortamı kullanılmıştır. Çimlenmesini tamamlayan primitif bitkilerin kök gelişimini sağlamaları amacıyla 0,1 mg/l IAA ihtiva eden MSD4 ortamı kullanılmıştır.

3.1.4.5. Kök Uru Hastalık Testlenmesinde Kullanılan Spor Kültürü

Spor sayımları yapılmış ve hesaplamalar sonrasında; hastalıklı topraklardan izole edilmiş ve 10 ml içerisinde; 10^{+7} spor yoğunluğuna sahip Ordu-Kabadüz spor kültürü testlemede kullanılmıştır.

3.1.4.6. Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Diğer Materyaller

Testlemede kullanılan saf steril su, su ağarı, bitki dikme aparatı, aliminyum folyo ve cam malzemeler (petriler, tüpler, beherler ve cam kavanozlar), plastik saksılar, etiket vb. malzemeler OMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiş ve kullanılmıştır.

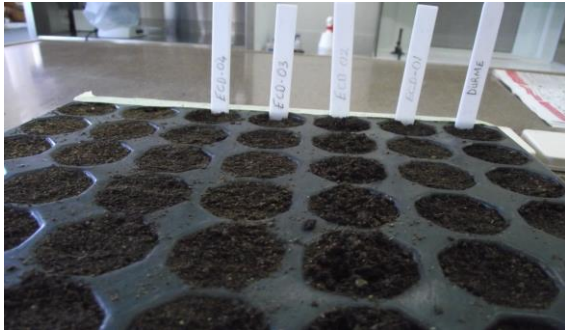
3.2.YÖNTEM

3.2.1. Toprak Hazırlığı

3.2.1.1. Ebeveyn Bitkilerin Tohumlarının Çimlendirilmesinde Kullanılan Toprağın Hazırlanması

Çimlendirme ortamı olarak kullanılan 1/2 torf + 1/2 bahçe toprağı karışımı elekten geçirildikten sonra her bir viyol gözüne (her biri 3,5 cm çapında ve 7x12 toplam 84 gözlü viyol) üstten 0,5 cm boşluk kalacak biçimde doldurulmuştur. Toprak dolu viyoller uygun ortamda bekletilerek çimlendirme aşamasında kullanılmıştır (Şekil 3.1).

a)



b)



Şekil 3.1. Toprak Hazırlığı ve Ekim; a) Viyole Toprak Karışımı Hazırlığı, b) Viyole Tohum Ekimi

3.2.1.2. Yetiştirme Aşamasında kullanılan Toprağın Hazırlanması

Yetiştirme aşamasında 1/3 torf + 1/3 bahçe toprağı + 1/3 yanmış ahır gübresinden oluşan karışım elekten geçirildikten sonra 4 numaralı saksılara, üstten 1 cm boşluk kalacak biçimde doldurulmuştur. Toprak dolu saksılar, kullanılıncaya kadar uygun ortamda muhafaza edilmişlerdir.

3.2.1.3. Tarla Koşullarında Kullanılan Toprağın Hazırlanması

Ebeveyn bitkilerin tarla şartlarında yetiştirilmesinde, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesinin Araştırma-Uygulama alanındaki araziden yararlanılmıştır. Arazı iki sürüm sonrası tırmıkla düzeltilmiş ve parselasyon sonrası çapa kullanılarak düzenlenmiştir.

3.2.1.4. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Toprağı Hazırlanması

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ali Nihat Gökyiğit Araştırma İstasyonundan, Toprak pH'sı 6,21 olan toprak alındıktan sonra (Şekil 3.2), kurutulmuş ve elekten geçirilmiştir. Toprak satire çözültüsü hazırlanıp pH'sı kontrol edilmiştir. Hazırlanan toprak yanmaz poşete konularak, ağzı klipsle iyice kapatıldıktan sonra Etüvde 165 °C'de 2,5 saat tutularak steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası toprak testleme yapılcaya kadar uygun ortamda muhafaza edilmiştir.

a)



b)



Şekil 3.2. Araziden Toprak Alımı; a) Toprak Profilinin Ölçülmesi, b) Toprak Örneğinin Alınması.

3.2.1.5. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Kum Materyalinin Hazırlanması

Testlemede kullanılan kum materyali Samsun-Bafra Kızılırmak nehrinden alınmış, taşıma kabına yayılarak nemi uçurulmuş ve yanmaz poşete konularak, ağzı klipsle iyice kapatıldıktan sonra etüvde 165 °C’de 2,5 saat steril edilmiştir (Şekil 3.3). Sterilizasyon sonrası kum testleme yapıncaya kadar uygun ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.1.6. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Perlit Materyalinin Hazırlanması

Testlemede kullanılacak perlit, 1 lt veya 0,5 lt cam kavanoz içerisine konulduktan sonra, otoklovda 121 °C’de 35 dakika süreyle tutularak sterilize edilmiştir (Şekil 3.3). Sterilizasyon sonrası perlit testleme yapıncaya kadar uygun ortamda muhafaza edilmiştir.

a)



b)



Şekil 3.3. Testlemede Kullanılan; a) Perlit ve b) Kum Materyallerinin Hazırlanması

3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması

3.2.2.1. Embriyo Kültür Ortamının Hazırlanması

Embriyo kültüründe hazır MS5519 (Murashige and Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmış olup ortama karbonitrat kaynağı olarak 10 gr/l şeker ve katılaştırıcı olarak 7 gr/l agar ilave edilerek ortamının pH’sı 5,8’e ayarlanmıştır. Kullanılan besi ortamının içeriğine ilişkin veriler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

3.2.2.2. Sürgün Gelişimi Ortamının Hazırlanması

Sürgün gelişimi amacına yönelik olarak MSD4 besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamına bitki büyüme düzenleyicisi olarak 0,1 mg/l IAA (Indole-3-Asetik Asit) ve 0,5 mg/l BAP (Benzil Amino Pürin) ilave edilmiştir. Ayrıca besi ortamına karbonitrat kaynağı olarak 30 gr/l şeker ve katılaştırıcı olarak 7 gr/l agar ilave edilerek ortamının pH'sı 5,8'e ayarlanmıştır. Kullanılan besi ortamının içeriğine ilişkin veriler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

3.2.2.3. Kök Gelişimi Ortamının Hazırlanması

Kök gelişim ortamı olarak MSD4 besi ortamı kullanılmış olup besi ortama bitki büyüme düzenleyicisi olarak 0,1 mg/l IAA, karbonitrat kaynağı olarak 30 gr/l şeker ve katılaştırıcı olarak 7 gr/l agar ilave edildikten sonra ortamının pH'sı ise 5,8'e ayarlanmıştır. Kullanılan besi ortamının içeriğine ilişkin veriler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

3.2.2.4. Lahana Kök Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Besi Ortamının Hazırlanması

Testleme yapılacak melez bitkilerin elde edilmesi için tohumlar steril edildikten sonra çimlenmeleri için MSD4 besi ortamına ekilmişlerdir. Çimlenmesini tamamlayan primitif bitkiler MSD4 kök besi ortamına alınmıştır.

3.2.3. Sterilizasyon

3.2.3.1. Tohum Sterilizasyonu

Hastalık testlemesinde spor aşılması yöntemi uygulanacağı için tohumların steril edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla tohumlar % 70'lik alkol ile 1 dakika muamele edildikten sonra % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika çalkalanıp, ardından 3-5 defa steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 3.4).

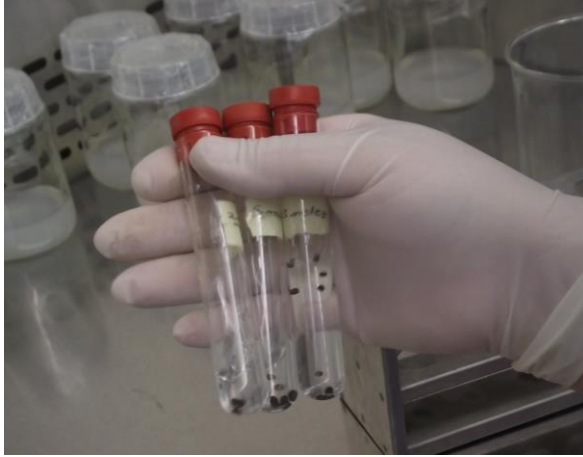
Çizelge 3.2. Kullanılan Besi Ortamları ve Kimyasal İçeriklerine İlişkin Veriler

Besi Ortamı Bileşenleri	Kimyasal Madde	Embriyo Kültür Ortamı (MS5519) (mg/l)	Sürgün Gelişimi Ortamı (MSD4)(mg/l)	Kök Gelişimi Ortamı (MSD4)(mg/l)
Makro Besin Elementleri	NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
	CaCl ₂ .H ₂ O	332,2	440	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	180,7	370	370
	KNO ₃	1900	1900	1900
	KH ₂ PO ₄	170	170	170
Mikro Besin Elementleri	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
	Na ₂ -EDTA	37,25	37,25	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,85
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	22,3	22,3
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25	0,25	0,25
	KI	0,83	0,83	0,83
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Vitaminler	Glycin	2,0	-	-
	Myo-Inostol	100	100	100
	Nicotinic asit	0,5	0,5	0,5
	Pyrodoxine-HCl	0,5	0,5	0,5
	Thiamin HCl	0,1	0,1	0,1
Hormonlar	IAA	-	0,1	0,1
	BAP	-	0,5	-
Diğerleri	Şeker	10000	30000	30000
	Agar	7000	7000	7000
	pH	5,8	5,8	5,8

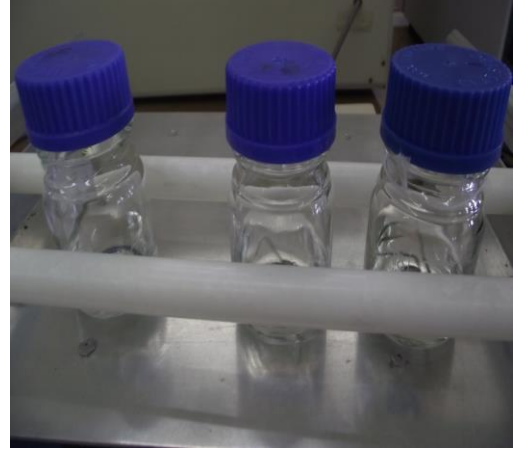
3.2.3.2. Harnup Sterilizasyonu

Mezleme sonrası tutan harnuplar 10-15 günlük olduklarında embriyo kültürü yapmak amacıyla hasat edilmiş ve laboratuvar koşullarında sterilize edilmişlerdir. Bu amaçla harnuplar bir cam şişe içerisine aktarıldıktan sonra % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi ile 10 dakika muamele edilip, ardından 3-5 defa steril saf su ile durulanmışlardır (Şekil 3.4b).

a)



b)



Şekil 3.4. Sterilizasyon; a) Hastalık Testlemesi İçin Tohum Sterilizasyonu b) Embriyo Kültürü İçin Harnup Sterilizasyonu

3.2.3.3. Lahana Kök-Uru Hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Diğer Materyallerin Sterilizasyonu

Testlemede kullanılmak üzere saf steril su, su agarı, bitki dikme aparatı, aliminyum folyo, cam malzemeler (beherler, cam kavanozlar ve farklı büyüklüklerde cam petriyer) otoklavda steril edilmiştir. Kullanılan bu alet ve ekipmanlar; OMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiş ve kullanılmıştır.

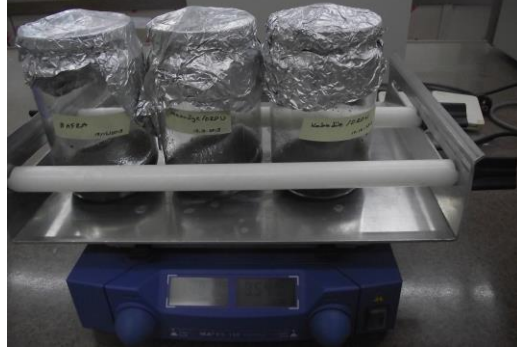
3.2.4. Lahana Kök Uru hastalığının Testlenmesinde Kullanılan Spor Materyalinin Hazırlanması

Testlemesinde steril bitkilere aşılama yöntemi uygulanacağı için hastalığın görüldüğü Ordu-Mesudiye, Ordu-Kabadüz ve Samsun-Bafra'dan getirilen topraklardan hastalık sporları izole edilmiştir. Bu amaçla temin edilen topraklar laboratuvar koşullarında dövülüp, elekten geçirildikten sonra 10 gr toprak 1gr/litre agar ihtiva eden 90 ml çözelti içerisinde 10 dakika çalkalayıcıda çalkalanıp, 20 dakika dinlendirildikten sonra, karışımdan birkaç damla çözelti Thoma Lamı üzerine damlatılmış ve üzerine lamel kapatılarak elektrik mikroskobu altında incelenerek spor varlığı George (2004)'e göre tespit edilmiştir (Şekil 3.5).

a)



b)



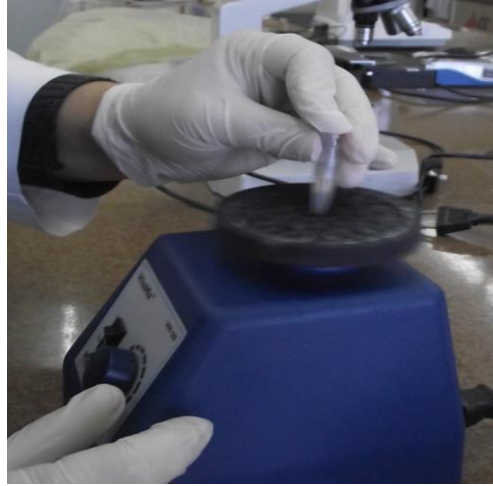
Şekil 3.5. Topraktan Spor İzolasyonu Çalışmaları; a) Lokasyonlara Ait Toprak Örnekleri, b) Hastalık Sporlarının Su Agarına Tutunması

Toprak örneklerinde sporların varlığı tespit edildikten sonra çözelti içerisindeki spor yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla preparatlar hazırlanmıştır. Bu amaçla sporlu çözeltilerden 10 mikro litre alınıp, ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 990 mikrolitre steril saf su eklenerek toplam çözelti miktarı 1 ml'ye ayarlanmıştır. Çözelti, düşük devirde, kısa süre vortex yapılmıştır. Hazırlanan yeni çözeltilerden 10 mikrolitre alınıp yeni bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 990 mikrolitre steril saf su ilave edilip düşük devirde, kısa süre vortex yapılmıştır (Şekil 3.6).

a)



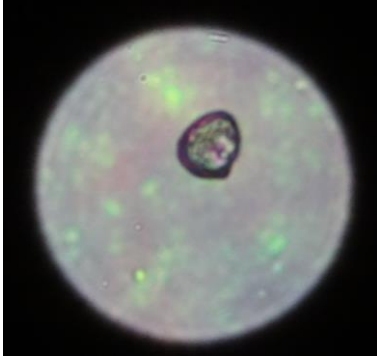
b)



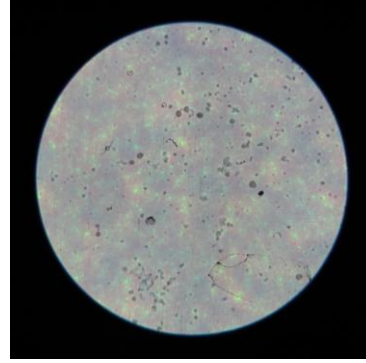
Şekil 3.6. İzolatların hazırlanması; a) Ependorf Tüplerine Örnek aktarılması, b) Vortex yapılması

Vortexlenmiş karışımdan steril pipetle birkaç damla alınarak Thoma Lamı üzerine damlatılmış ve üzerine lamel kapatılarak elektron mikroskop altında spor sayımı yapılmıştır (Şekil 3.7).

a)



b)



Şekil 3.7. Mikroskop Altında; a) Spor Tespiti ve b) Mikroskop Altında Sporların Genel Görünüşü

Testlemede kullanılacak olan toprakta istenilen düzeyde spor yoğunluğuna (1×10^7 spor/ml) ulaşılmasını sağlamak amacıyla matematiksel hesaplaması (Xue ve diğ., 2008) ve literatür (Le Boldus ve diğ., 2012) dikkate alınarak unokulum yoğunluğu 1×10^7 spor/ml olacak biçimde toprağa spor aşılması yapılmıştır. Bu amaçla her bir saksıya inokülüm yoğunluğu 1×10^7 spor/ml olacak biçimde 300 gr sporlu toprak aktarılmış ve her saksıda 1 bitki yetiştirilmiştir (Şekil 3.8).

Her bir saksının üzeri steril edilmiş aliminyum folyo ile kapatılmış ve lastik bantla saksının kenarına sıkıca tutturulmuştur. Hastalık sporları toprakla inkübe edilmesi için oda sıcaklığında saksılar bir hafta bekletilmiştir. Zoospor oluşumunu hızlandırmak için saksılar, 2–3 gün sulanmamıştır (Gerrick ve Duffus, 1988).

a)



b)



Şekil 3.8. a) Toprak, Kum ve Perlit Karışımının Steril Kavanozda Karıştırılarak Saksılara Aktarılması, b) Testlemede Kullanılacak Sporla Toprak Karışımının 1 Hafta İnkübe Edilmesi

3.2.5. Embriyo Kültürü Amacına Yönelik Yapılan Uygulamalar

3.2.5.1. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirilmesi

Laboratuar koşullarında, her bir ebeveyn genotip, 3 hafta ara ile olmak üzere, altı farklı ekim zamanında, viollere, her violde 1 bitki ve toplam her genotip 12 bitki olacak şekilde ekilmiştir. Çıkıştan 1 hafta sonra, sağlıklı fideler 4 numaralı saksılara şaşırtılmıştır. Bu bitkiler gelişmelerini tamamlamaları için, şaşırtmadan 3 gün sonra sera koşullarına aktarılmışlardır. Sera koşullarında 10-12 yapraklı döneme ulaşan bitkiler vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla iklimlendirme odasına aktarılmışlardır. İklimlendirme odasında 3 ay süre ile tutulan bitkiler, tekrar sera veya arazi koşullarına aktarılmış ve akabinde çiçeklenen bitkilerde melezlemeler yapılmıştır (Şekil 3.9).

a)



b)



c)



d)

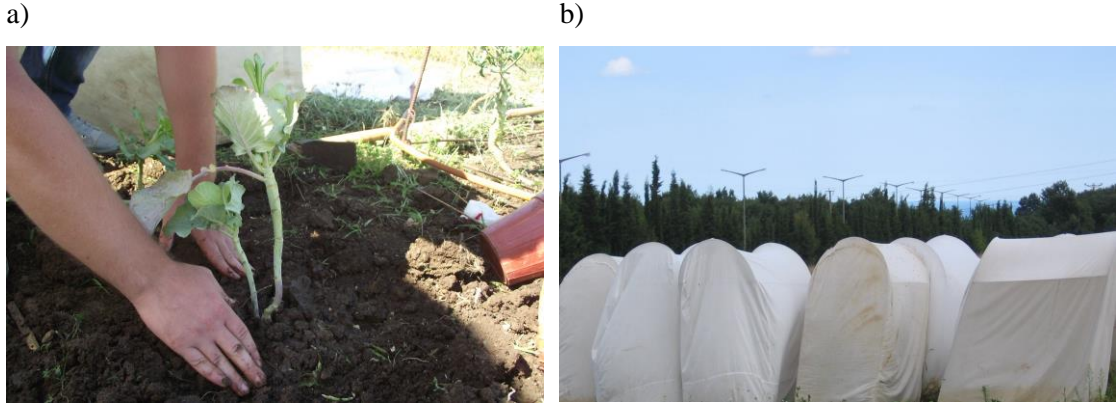


Şekil 3.9. Ebeveyn Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Vernalizasyonu; a) Saksılara Şaşırtılması, b) Sera Koşullarında Gelişimi, c) Dürme Çeşidinin ve d) Şalgam Hatlarının Vernalize Edilmesi

3.2.5.2. Brassica Türleri Arasında Melezlemelerin Yapılması

Vernalizasyon ihtiyacını karşılayan bitkiler arazi veya sera koşullarına şaşırtılmışlardır. Şaşırtılan ortamda melezleme olgunluğuna gelen çiçek tomurcuklarında, ana ebeveyn olarak dürme çeşidi ve baba ebeveyn olarak da şalgam hatları olmak üzere melezlemeler yapılmıştır. Melezleme günün sıcaklık ve güneşleme durumuna göre sabah saatlerinde veya öğleden sonra yapılmıştır.

Yaz sezonunda sera koşullarında bitkilerin aşırı sıcaktan (yaklaşık 40-60 °C) zarar görmelerinden dolayı melezlenen bitkilerde döl tutma oranı oldukça düşmüştür. Hatta bitkiler normal fizyolojilerini sürdürmekte de zorlanmışlardır. Bu olumsuz durumun etkisini azaltmak amacıyla, vernalizasyonunu tamamlayan bitkilerin bir kısmı arazi koşullarına aktarılmış ve burada melezlemeler yapılmıştır. Arazi koşullarında yabancı döllenenin önlenmesi amacıyla izolasyon kafesleri kullanılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Vernalizasyon Sonrası Ebeveyn Bitkilerin; a) Araziye Şaşırtılması, b) İzolasyon Kafesleriyle İzole Edilmesi

Melezlemeye başlamadan önce cimbriz alkolden geçirilmiştir. Ana ebeveynde henüz açmamış çiçek tomurcuğunda emaskulasyon yapılmıştır. Emasküle edilen çiçek tomurcuklarına baba ebeveynin anterleri sürülmüştür. Çiçek tomurcuğunun olgunluğu dikkatle incelenmiş ve melezleme olgunluğuna ulaşmamış olanlara izolasyon torbası geçirilerek bir gün bekletilmiş, ertesi gün melezleme yapılmıştır. Melezleme açısından olgunluklarını tamamlamış olan çiçek tomurcuklarında aynı gün içerisinde melezlemeler yapılmıştır. Melezlenen çiçek tomurcuklarına etiket bağlanarak, izolasyon poşeti geçirilmiş ve klips ile tomurcukların boyunlarından izolasyon poşetleri tutturulmuştur (Şekil 3.11). Arazi koşullarında yapılan melezlemelerde son aşama olarak melezlemenin yapıldığı bitkiler izolasyon kafesleri ile kapatılmıştır.

a)



b)



c)



d)



Şekil 3.11. Arazi Koşullarında; a) Çiçek Tomurcuğu Oluşumu, b) Çiçeklenme, c) Emaskulasyon, d) Melezleme

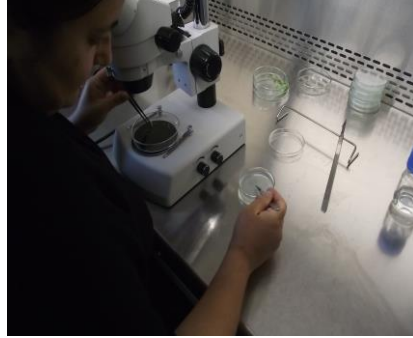
3.2.5.3. Harnup Hasadı

Melezlemeden 10-15 gün sonra tohum tutan harnuplar izole edilerek laboratuvar koşullarına aktarılmış ve yukarıda da açıklandığı gibi sterilize edilmişlerdir (Şekil 3.12).

a)



b)

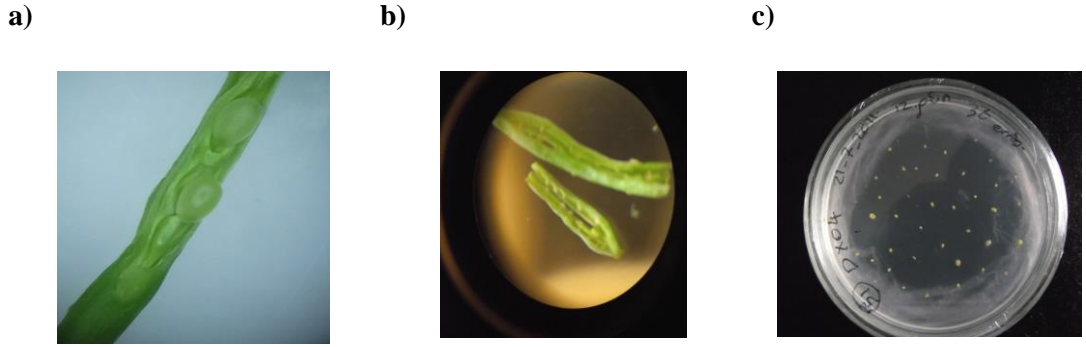


Şekil 3.12. Ebeveyn Bitkilerden; a)Harnup Hasadı, b)Harnuplardan Embriyoların Çıkarılması

3.2.5.4. Melez Embriyoların Kültürü

Sterilize edilen harnuplardan tohum taslakları, steril kabinde, binoküler mikroskop altında çıkarılmıştır. Çıkarılan tohum taslakları MS5519 besi ortamı ihtiva eden cam petrilere aktarılmışlardır. Besi ortamına aktarılan primitif embriyolar, çimlenmeleri için 25 °C

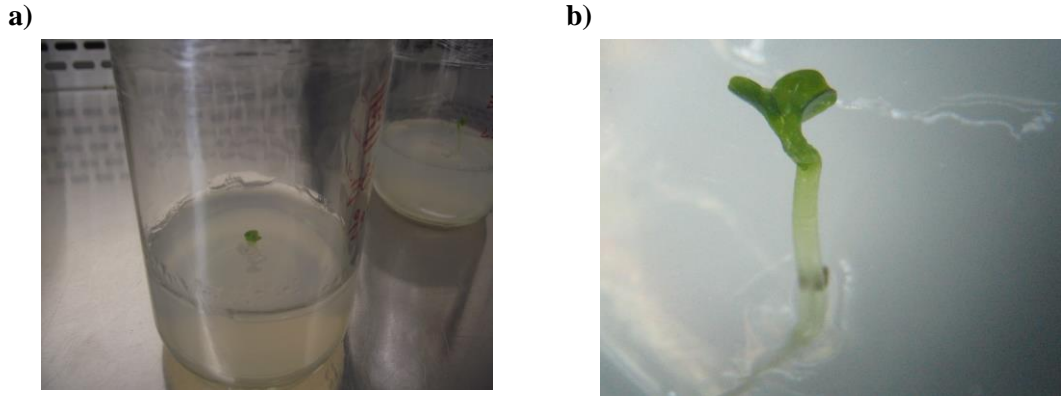
sıcaklık, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ihtiva eden iklim odasına aktarılmışlardır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. a) Tohum Taslaklarının, b) Binoküler Mikroskop Altında Embriyoların ve c) Besi Ortamındaki Ekilmiş Embriyolar Genel Görünüşleri

3.2.5.5. Melez Embriyolardan Bitkicik Oluşumu

Besi ortamına ekilen primitif embriyolardan farklılaşmanın gözlenmesinden birkaç gün sonra oluşan primitif bitkicikler sürgün ortamına aktarılarak gelişmeleri teşvik edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Besi Ortamında; a) Embriyo Farklılaşması ve b) Sürgün Oluşumu

3.2.5.6. Sürgün ve Kök Gelişim Ortamlarına Şaşırtma

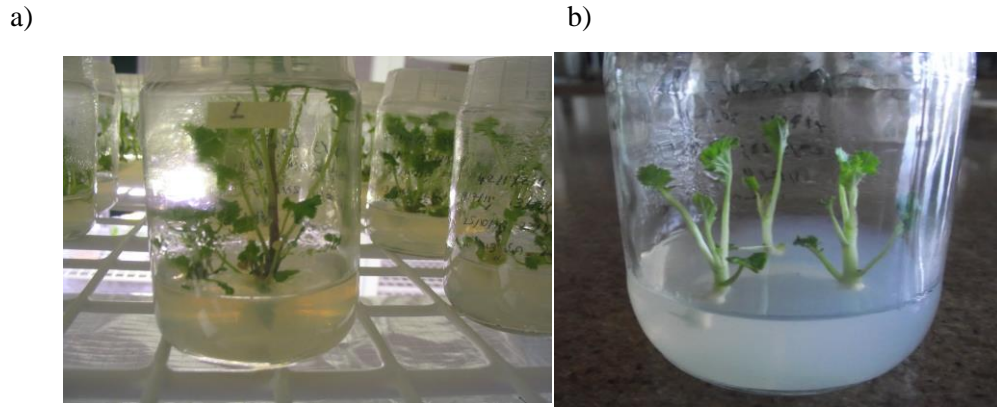
Besi ortamında belirli bir büyüklüğe ulaşan primitif sürgünler önce kök gelişim ortamına aktarılmışlardır. Tatmin edici miktarda (saçak kökler birkaç cm olduklarında) kök gelişimini tamamlayan ve normal bitki formatına gelen primitif bitkicikler sürgün gelişim ortamına aktarılmışlardır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Besi ortamında; a) Sürgün Gelişimi, b) Kök Gelişimi, c) Gelişmesini Tamamlamış Bitkilerin Genel Görünüşü

3.2.5.7. Alt Kültüre Alma

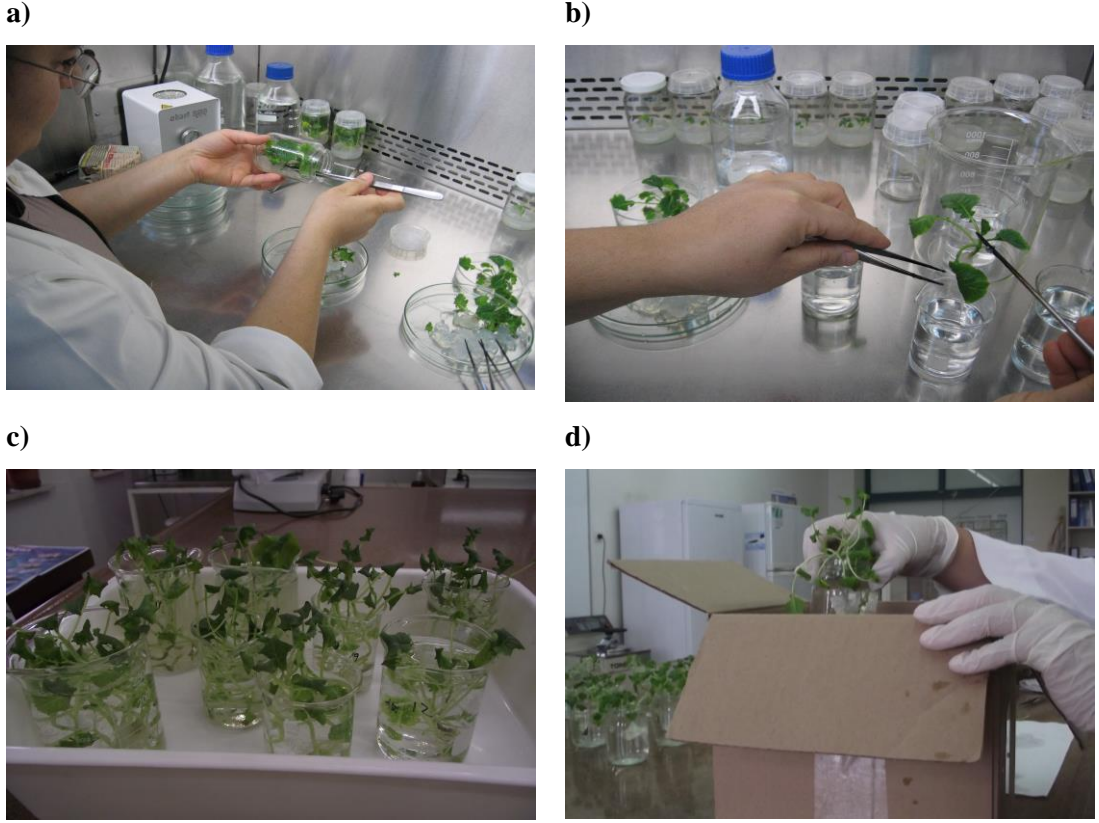
Besi ortamında kök ve sürgün gelişimini tamamlayan ve çok sayıda bitkiyi bir arada bulunduran bitki kitlesi birbirinden dikkatli bir biçimde ayrılarak alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. a) Alt Kültüre Alınmadan Önce ve b) Alt Kültüre Alındıktan Sonra Bitkiciklerin Genel Görünüşü

3.2.5.8. Haploid Bitkilerin Katlanması

Besi ortamında melez embriyolardan elde edilen ve yeterli gelişme aşamasına (3-4 yapraklı ve saçak kök oluşumu tamamlandığında) ulaşan haploid bitkilerin katlanmasında bir seri işlem yapılmıştır. Önce bitkiler besi ortamından steril suya alınarak köklerindeki agar ve diğer kimyasal maddelerin temizlenmesi sağlanmıştır. Ardından % 0.05'lik Kolhisin çözeltisi ihtiva eden beher veya cam magenda kaplarına aktarılıp, 1 gece karanlık ortamda bekletilmişlerdir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Haploid Bitkilerin; a) Köklenme Ortamından Alınması, b) Köklerin Ağardan Temizlenmesi, c) Katlama Ortamına Alınması, d) Katlamaya Alınan Bitkilerin Karanlık Ortama Aktarılması

3.2.5.9. Katlama Sonrası Alıştırma ve Şaşırtma

Katlama sonrası bitkiler normal musluk suyu ihtiva eden cam kaplara alınarak bir süre bekletilerek ortam şartlarına alışmaları sağlanır. Birkaç gün sonra gelişmelerine yeniden başladığına kanaat getirildiğinde bitkiler içinde karışım bulunan (materyal bölümünde açıklanmıştır) 4 numaralı saksılara şaşırtılmışlardır. Şaşırtma sonrası bitkiler bir süre daha lanbaratuvar koşullarında alıştırdıktan sonra sera koşullarına aktarılmışlardır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Katlama Sonrası Bitkileri; a) Aklimize Edilmesi, b) Toprağa Şaşırtılması, c) Saksıda Aklimize Edilmesi

3.2.5.10. Double Haploid Melez Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Vernalizasyon

Sera koşullarına aktarılan double haploid melez bitkiler, mevsim şartlarına bağlı olarak 2-4 aylık bir sürede gelişimlerini sürdürmüşlerdir. Sera koşullarında 10-12 yaprak ihtiva eden büyüklüğe ulaşan bitkiler, vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması için iklimlendirme odasına aktarılmışlardır. İklimlendirme odasında +4 °C'de 3 aylık bir sürede bitkiler vernalize edilmişlerdir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. İklimlendirme Odasında Vernalize Olan Bitkilerin Genel Görünüşü

3.2.5.11. Double Haploid Melez Bitkilerin Kendilenmesi ve Tohum Hasadı

İklimlendirme odasında 3 ay süre ile vernalize olan bitkiler, gelişmelerinin diğer bölümünü tamamlamaları ve çiçeklenme döneminde kendilenmelerini sağlamak amacıyla tekrar sera koşullarına aktarılmışlardır. Mevsim şartlarına bağlı olarak 1-2 hafta içerisinde bitkilerde sapa kalkma ve akabinde çiçek tomurcukları oluşmaya başlamıştır. Tomurcukları belirgin hale gelen bitkilere izolasyon poşeti geçirilerek dışarıdan çiçek tozu alması önlenmiştir. İzolasyon poşeti içerisinde açan çiçeklerde kendilemeler yapılmış ve tohum bağlayan harnupların kaydı tutulmuştur (Şekil 3.20). Tohumları olgunlaşan harnuplar hasat edilmiş ve laboratuvar koşullarında harman edilmiştir.

Elde edilen tohumlar testlemede kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Bitkilerin büyüme ve gelişme aşamalarında sürekli kontroller yapılarak gerekli olan etiketleme ve bakım işlemleri yapılmıştır.

Sera koşullarında bitkiler gelişimlerini sürdürürken yaz sezonunda sıcaklıkların artması ve sera içinde nemin yükselmesinden dolayı bitkiler zaman zaman külleme ve yaprak bitine maruz kalmışlardır. İhtiyaç duyulduğunda farklı aralıklarla külleme için Cornell 50Wp %50 w/wBenomyl 1gr/litre ve yaprak biti için, Match 050 EC 1ml/litre ilaçlama yapılmıştır.

a)



b)



Şekil 3.20. Vernalizasyon Sonrası Sera Koşullarında Double Haploid Bitkilerde; a) Kendileme ve b) Harnup Oluşumu

3.2.6. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesinde Uygulanan Yöntemler

Hastalık testlemesi birkaç aşamada yapılmıştır. Yapılan uygulama aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.2.6.1. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulacak Steril Bitkilerin Yetiştirilmesi

Hastalık testlemesinde 2013 yılında elde edilen DXECD-04 melez kombinasyonuna ait 8 melez bitkinin tohumları, sistemi eksiksiz bir şekilde test etmek ve kolaylık olması bakımından 5 farklı zamanda olacak biçimde besi ortamına ekilmiştir. Ekilen toplam 215 adet tohum ve ekim zamanlarına ilişkin veriler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Testleme öncesi sterilize edilen tohumlar MSD4 besi ortamına ekilmiş olup, çimlenen primitif bitkicikler, köklenmeleri için 200 mg/l IAA ihtiva eden MSD4 besi ortamının bulunduğu 1 litrelik cam kavanozlara aktarılmışlardır (Şekil 3.21). Bitkicikler, testlemeye kadar gelişimlerini tamamlamaları için iklim odasına aktarılmışlardır.

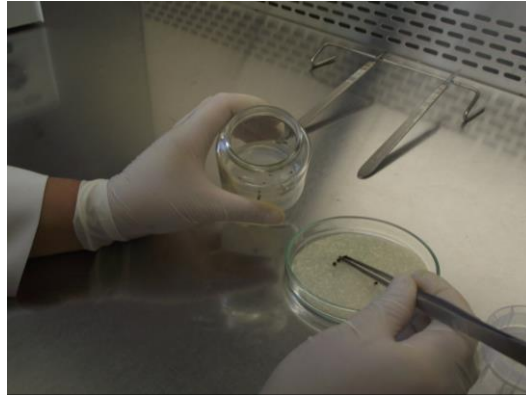
Çizelge 3.3. Testlemede Kullanılan DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Tohum Sayılarına İlişkin Veriler

Melez No	Tohum Sayısı	Testleme Zamanı				
		1	2	3	4	5
1.Melez	13	4	4	3	-	-
2.Melez	14	4	4	4	-	3
3.Melez	70	10	10	15	20	15
4.Melez	60	10	10	15	10	15
5.Melez	30	10	5	5	5	5
6.Melez	8	-	-	3	3	2
7.Melez	9	-	5	-	2	2
8.Melez	7	-	2	-	-	5
Toplam	210	38	40	45	40	47

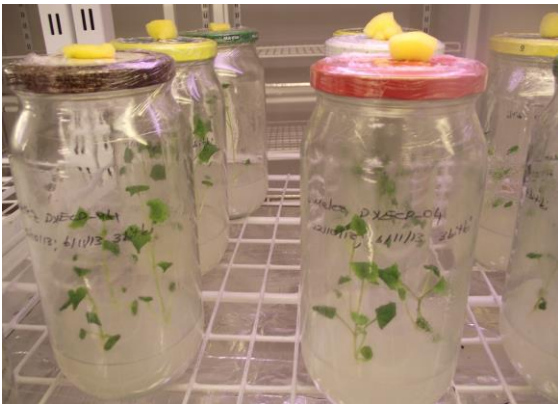
a)



b)



c)



d)



Şekil 3.21.Testleme için; a) Tohum Sterilizasyonu, b) Besi Ortamına Tohum Ekimi, c) Double Haploid Melez Bitkiler, d) Kontrol (Dürme) Bitkilerin Genel Görünüşü

3.2.6.2. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulacak Steril Bitkilerin Aşılı Toprağa Şaşırtılması ve Sulanması

Köklenmesini tamamlamış, doku kültüründen gelen double haploid melez bitkiler steril kabinde çıkarılmıştır. Steril saf suyla kökleri iyice yıkanan ve kurulan bitkiler, spor aşılması yapılmış saksılara dikkatlice şaşırtılmıştır. Şaşırtma işlemi bittikten sonra steril aliminyum folyo ile saksılar yeniden sarılmıştır. Can suyu için 20 mikrolitre otomatik pipetle saf steril su her bir saksıya verilmiştir.

Şaşırtmayı takip eden ilk hafta saf steril su bitkilerin üzerlerine püskürtülmüştür. Bitkilerin akklimatize edilmesi için yaklaşık iki hafta laboratuvar ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bitkilerin gelişimlerini devam ettirmeleri için bitkiler açık alana sahip üzeri kapalı balkona alınmışlardır. Hava durumuna ve bitkilerin su tüketimleri dikkate alınarak, testlemenin bittiği zamana kadar haftada 1 veya 2 defa olmak üzere saksılar steril saf su ile sulanmıştır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Testlemeye Alınan Bitkilere; a) Su Verilmesi, b) Gelişimlerini Sürdürmesi, c) Saksıların Örtülerin (Aliminyum Folyo) Açılması

Testlemenin yapıldığı her bir saksı için 1. ekim zamanda 574 ml, 2. ekim zamanda 554 ml, 3. ekim zamanında 599 ml, 4. ekim zamanında 339 ml ve 5. ekim zamanında 314 ml su kullanılmıştır.

3.2.6.3. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Tabi Tutulan Bitkilerde Hastalık Okumalarının Yapılması

Hastalık sporlarıyla aşılınmış double haploid melez bitkiler lahana kök-uru hastalığının (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) Karadeniz Bölgesinde tespit edilen ECD 16/31/31 irkına karşı hastalık testlemesine tabii tutulmuştur. Bu amaçla inokülasyonlu toprağa bitkiciklerin şaşırtılmasından yaklaşık 70 gün sonra lahana kökleri incelenerek, 0-3 skalası yardımıyla hastalık okumaları Port ve diğ. (2003)'a göre yapılmıştır. Kullanılan 0-3 skalasına göre; 0= Kökte urlaşma yok, 1= Sadece lateral köklerde urlaşma var, 2= Ana kökte % 50'den az urlaşma var, 3= Ana kökün % 50'den fazlası urlu.

Yapılan hastalık okumalarına göre double haploid melez bitkiler ve kontrol çeşiti için 0= dayanıklı, 1= hassas, 2= hassas, 3= hassas şekilde reaksiyon kategorisi oluşturulmuştur.

Hastalık testlemesi yapılan bitkilerde dayanıklılık gösteren kombinasyonlara ait bitkiler incelenmiş ve resimlenerek kayıt altına alınmışlardır. Daha sonra bitkiler yetiştirme ortamı karışımı ihtiva eden beş numaralı saksılara şaşırtılmış ve vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması için iklimlendirme odasına aktarılmışlardır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ebeveyn Bitki Sayısı

Araştırmada melezlemek amacıyla yetiştirilen ebeveyn bitkilere ilişkin veriler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’in incelenmesinden de anlaşılacağı melezlemelerde çiçeklenme periyodunu geniş tutmak amacıyla birinci yıl 4 ekim zamanında toplam 240 ve ikinci yıl 3 ekim zamanında toplam 180 bitki olmak üzere genel toplamda 420 ebeveyn bitki yetiştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Ebeveyn Bitkilerin Ekim Zamanları, Yetiştirme Aşamalarında Kullanılan Alanlar ve Yetiştirilen Bitki Sayılarına İlişkin Veriler

Ekim Zamanları	Bitki Yetiştirme Aşamalarında Kullanılan Alanlar	Yetiştirilen Ebeveyn Bitki Sayısı (adet)		
		<i>B. oleracea</i>	<i>B. rapa</i>	Toplam
I. YIL				
1	Laboratuvarda ekim→ serada yetiştirme→	12	48	60
2	iklim odası veya arazide vernalize etme→	12	48	60
3	arazide veya serada çiçeklenme→	12	48	60
4	melezleme→ harnup hasadı→ laboratuvarda besi ortamına embriyo ekimi→ doku kültür odasında yetiştirme	12	48	60
II. YIL				
1	Laboratuvarda ekim→ serada yetiştirme→	40	20	60
2	iklim odasında vernalize etme→ arazide veya	40	20	60
3	serada çiçeklenme→ melezleme→ harnup hasadı→ laboratuvarda besi ortamına embriyo ekimi→ doku kültür odasında yetiştirme	40	20	60
Toplam		168	252	420

Çizelge 4.1'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi yetiştirilen bu bitkilerin ekimlerinden hasatlarına kadar olan süreçte yapılan işlemlere ve yetiştirilme ortamları bakımından çok yoğun uygulamalar yapılmıştır. Örneğin ilk yıl yetiştirilen bitkiler önce laboratuvar koşullarında ekilmiş ardından sera koşullarına aktarılmıştır. Sera koşullarında belirli bir aşamaya geldikten sonra vernalizasyonu karşılamak amacıyla bir kısmı iklimlendirme odasına, bir kısmı ise tarla koşullarına aktarılmışlardır. İklim odasında vernalizasyon ihtiyacını karşılayan bitkiler sera koşullarına aktarılmışlardır. Tarla ya da sera koşullarında çiçeklenme aşamasında ebeveyn türler arasında melezlemeler yapıldıktan sonra tutan harnuplar hasat edilerek laboratuvar koşullarında embriyo kültürü için gerekli işlemler yapılmıştır. Birinci yıl eksik olan melez kombinasyonların tamamlanmasına yönelik olarak 2. yıl yeniden ekim yapılmış ve vernalizasyonun tarla koşullarında sağlanması hariç birinci yıl yapılan işlemlerin aynısı ikinci yıl tekrarlanmıştır.

Birinci yıl hava sıcaklığına ve gün uzunluğuna bağlı olarak vernalizasyon sonrası yaklaşık 10-15 gün içerisinde bitkilerde çiçeklenme gözlenmiştir. Melezleme olgunluğuna gelen çiçek tomurcuklarında, lahanaya gen aktarımı hedeflendiği için melezlemelerde ana ebeveyn olarak lahana (Dürme), baba ebeveyn olarak şalgam hatları kullanılmıştır. Yaz sezonunda, sera koşullarında bitkilerin aşırı sıcaktan (40-60 °C'lerde) zarar görmelerinden dolayı melezlenen bitkilerde döl tutma oranı oldukça düşmektedir. Bitkilerin normal fizyolojilerini de sürdüremedikleri görülmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla, bitkiler arazi koşullarına aktarılmış ve burada melezlemeler yapılmıştır. Arazi koşullarında kontrolsüz polen yayılımının önüne geçilmek için izolasyon kafesleri kullanılmıştır. Melezleme işlemleri havanın, sıcaklık ve güneşleme durumuna göre sabah veya öğle sonu olmak üzere yapılmıştır.

4.2. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayısı

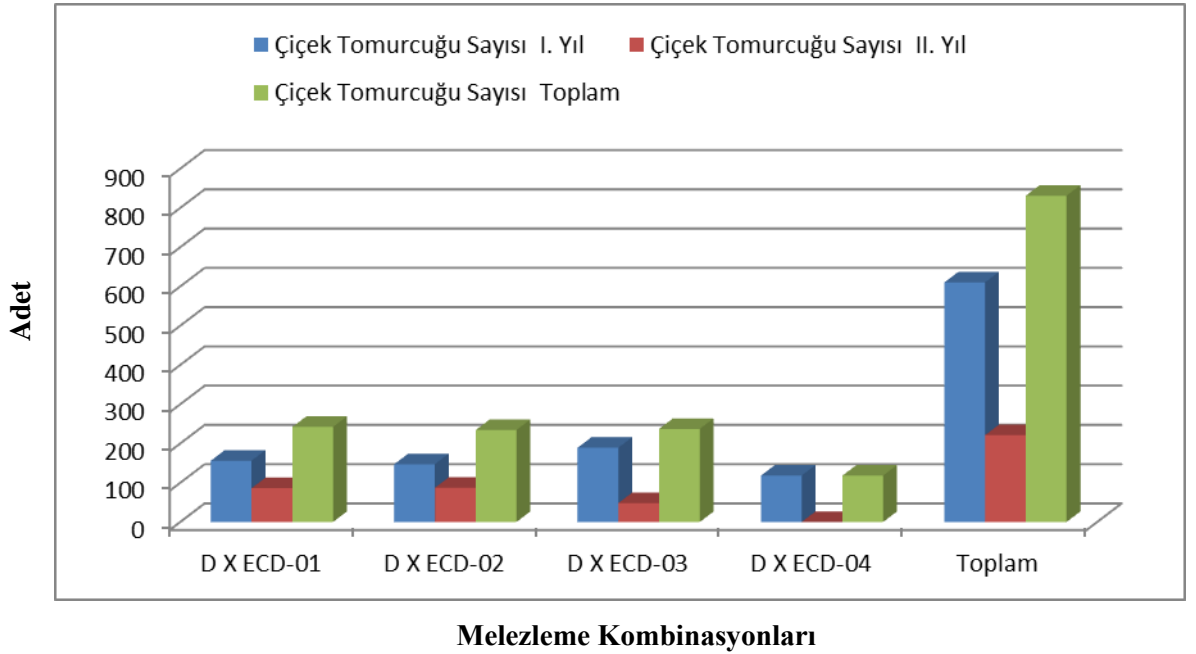
Araştırmalarda ebeveyn bitkiler arasında yapılan melezlemelerde kullanılan çiçek tomurcuğu sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.2'de ve çiçek tomurcuğu sayılarının kombinasyonlara göre dağılımları Şekil 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi bütün kombinasyonlarda 1. yıl melezlenen çiçek tomurcuğu sayısı, ikinci yıl melezlenen çiçek tomurcuğu sayısından daha fazladır. Kombinasyon bazında değerlendirildiğinde; DXECD-01 kombinasyonundan birinci yıl 156 ve ikinci yıl 86 çiçek tomurcuğu olmak üzere toplam 242 çiçek tomurcuğu, DXECD-02 kombinasyonundan birinci yıl 147 ve ikinci yıl 87 çiçek tomurcuğu olmak üzere toplam 234 çiçek tomurcuğu, DXECD-03 kombinasyonundan birinci yıl 189 ve ikinci yıl 48 çiçek tomurcuğu olmak üzere toplam 237 çiçek tomurcuğu ve DXECD-04 kombinasyonundan birinci yıl 118 çiçek tomurcuğu melezlenmiş olup 2. yıl melezleme yapılmamıştır. Birinci ve ikinci yıl

melezlenen çiçek tomurcuğu sayısı toplamda değerlendirildiğinde; iki yılın toplamı olarak 831 çiçek tomurcuğu melezlenmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayısı (adet)					
	I. Yıl		II. Yıl		Toplam	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%
D X ECD-01	156	25.6	86	38.9	242	29.1
D X ECD-02	147	24.1	87	39.4	234	28.1
D X ECD-03	189	31.0	48	21.7	237	28.5
D X ECD-04	118	19.3	-	-	118	14.2
Toplam	610	100.0	221	100.0	831	100.0

Melezlenen toplam çiçek tomurcuğu sayıları kombinasyonlar bazında değerlendirildiğinde; melezlenen toplam çiçek tomurcuklarının % 29.1'i DxECD-01 kombinasyonuna, % 28.1'i DxECD-02 kombinasyonuna, % 28.52'si DxECD-03 kombinasyonuna ve % 14.2'si DxECD-04 kombinasyonuna ait olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. Melezlenen Çiçek Tomurcuğu Sayılarının (adet) Kombinasyonlara Göre Dağılımı

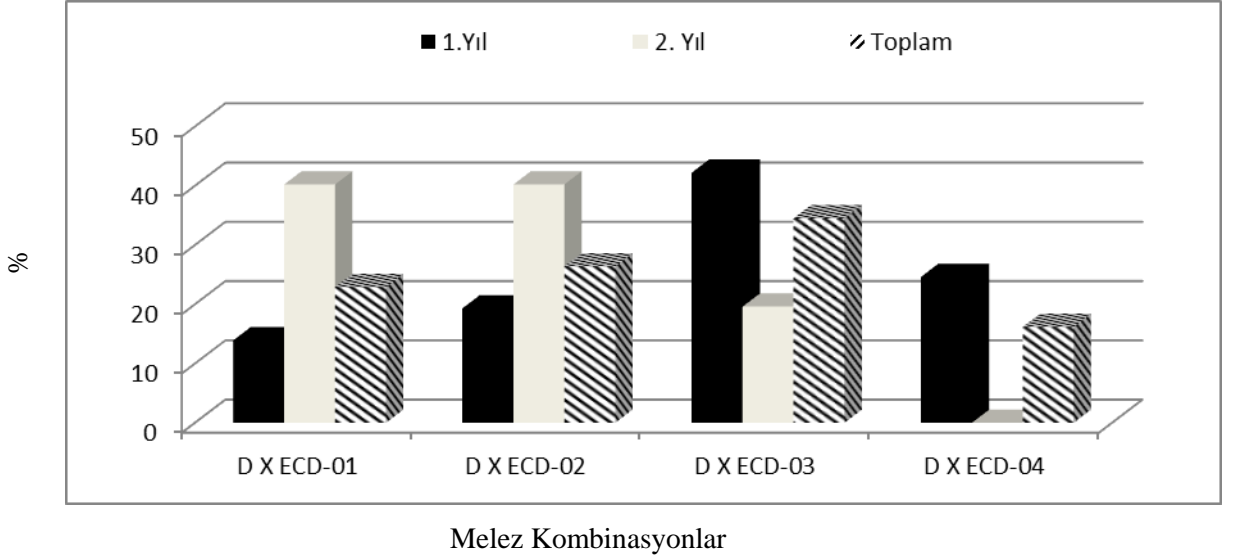
4.3. Hasat Edilen Melez Harnup Sayısı

Melezlemeler yapıldıktan 3-5 gün sonra çiçeklerde, dölleme olup olmadığı belirlenmiştir. Döllemenin olduğu tespit edilen melez harnuplar, melezlemeden itibaren 10-15 günlük olduklarında, embriyo kültürü amacıyla hasat edilerek sterilizasyon için laboratuvar koşullarına aktarılmışlardır. Hasat edilen melez harnup sayılarına ilişkin veriler çizelge 4.3 ve hasat edilen melez harnup sayılarının kombinasyon bazında dağılımları Şekil 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2’nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi I. yıl 187 ve II. yıl 97 olmak üzere toplam 284 melez harnup hasat edilmiştir. Hasat edilen harnup sayılarının kombinasyonlar bazında değerlendirildiğinde; DXECD-01 melez kombinasyonundan I. yıl 26, II. yıl 39, DXECD-02 kombinasyonundan I. yıl 36, II. yıl 39, DXECD-03 melez kombinasyonundan I. yıl 79, II. yıl 19 ve DXECD-04 melez kombinasyonunda I. yıl 46 melez harnup hasat edilmiştir.

Çizelge 4.3. Türlerarası Melezlemelerde Oluşan Melez Harnup Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Melez Harnup Sayısı (adet)					
	I. Yıl		II. Yıl		Toplam	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%
D X ECD-01	26	13.9	39	40.2	65	22.9
D X ECD-02	36	19.3	39	40.2	75	26.4
D X ECD-03	79	42.2	19	19.6	98	34.5
D X ECD-04	46	24.6	-	-	46	16.2
Toplam	187	100.0	97	100.0	284	100.0

Hasat edilen harnup sayılarının oransal olarak kombinasyonlara dağılımına bakıldığında; I. yıl hasat edilen toplam harnup oranının % 13.9’unu D X ECD-01 kombinasyonu, % 19.3’ünü D X ECD-02 kombinasyonu, % 42.2’sini D X ECD-03 kombinasyonu ve % 24.6’sını D X ECD-01 D X ECD-04 kombinasyonu karşılmasına karşın II. yıl hasat edilen toplam harnup oranının % 40.2’sini D X ECD-01 kombinasyonu, % 40.2’sini D X ECD-02 kombinasyonu ve % 19.6’sını D X ECD-03 kombinasyonu karşılamıştır.



Şekil 4.2. Türlerarası Melezlemelerde Oluşan Melez Harnup Sayılarının Oransal Olarak Kombinasyonlara Dağılımı

4.4. Harnup Oluşumundaki Başarı Oranı

Ebeveyn türler arasında melezlenen çiçek sayısına karşın oluşan harnup sayısı ve harnup oluşum oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.4’ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi 1. yıl harnup oluşum oranının % 30,7, 2. yıl % 43,9 ve her iki yıl birlikte değerlendirildiğinde % 34,2 olduğu saptanmıştır. İki yılın sonuçları bir arada değerlendirildiğinde harnup oluşum oranlarının kombinasyonlara göre dağılımında en yüksek payı % 41,4 ile D X ECD-03 kombinasyonunun aldığını, bu kombinasyonu % 39,0 ile D X ECD-04, % 32,1 ile D X ECD-02 ve % 26,9 ile D X ECD-01 kombinasyonunun takip ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Birinci yıl melez kombinasyonlar bazında harnup oluşumundaki başarı oranları değerlendirildiğinde; DXECD-01 melez kombinasyonunda % 16,7, DXECD-02 kombinasyonunda % 24,5, DXECD-03 melez kombinasyonunda % 41,8 ve DXECD-04 melez kombinasyonunda % 39,0’dur. İkinci yıl, DXECD-01 melez kombinasyonuna % 45,3, DXECD-02 melez kombinasyonunda % 44,8, DXECD-03 melez kombinasyonunda % 39,6 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Melezlenen Çiçek Başına Harnup Oluşum Oranlarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Tomurek	Melez	Harnup	%	Tomurek	Melez	Harnup	%	Tomurek	Melez	Harnup	%
	Sayısı	Harnup			Sayısı	Harnup			Sayısı	Harnup		
	I. Yıl			II. Yıl			Toplam					
D X ECD-01	156	26	16.7	86	39	45.3	242	65	26.9			
D X ECD-02	147	36	24.5	87	39	44.8	234	75	32.1			
D X ECD-03	189	79	41.8	48	19	39.6	237	98	41.4			
D X ECD-04	118	46	39.0	-	-	0.0	118	46	39.0			
Toplam	610	187	30.7	221	97	43.9	831	284	34.2			

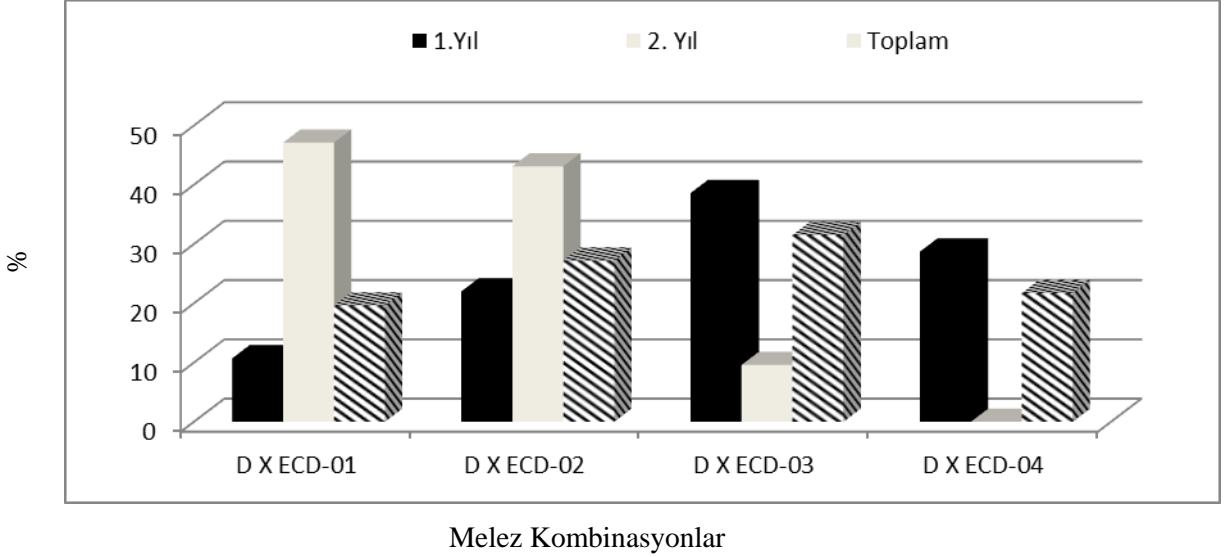
4.5. Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayısı

Melezlemeden sonra tutan harnuplar 10-15 günlük olduklarında hasat edilip laboratuvar koşullarında izolasyonu yapılan embriyolar besi ortamına aktarılmışlardır. Besi ortamına ekilen embriyo sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.5’de, besi ortamına ekilen embriyoların oransal olarak dağılımları ise Şekil 4.3’de verilmiştir. Çizelge 4.5’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi 1. yıl 2011 ve 2. yıl 652 olmak üzere toplam 2663 embriyo besi ortamına ekilmiştir. Besi ortamına ekilen embriyoların kombinasyonlar bazında dağılımına bakıldığında 1. yıl besi ortamına DxECD-01 kombinasyonundan 216, DxECD-02 kombinasyonundan 442, DxECD-03 kombinasyonundan 776 ve DxECD-04 kombinasyonundan 577 embriyo ekilmiş olup, ikinci yıl DxECD-01 kombinasyonundan 307, DxECD-02 kombinasyonundan 281 ve DxECD-03 kombinasyonundan 64 embriyo besi ortamına ekilmiştir.

Çizelge 4.5. Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayısı (adet)					
	I. Yıl		II. Yıl		Toplam	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%
D X ECD-01	216	10.7	307	47.1	523	19.6
D X ECD-02	442	22.0	281	43.1	723	27.2
D X ECD-03	776	38.6	64	9.8	840	31.5
D X ECD-04	577	28.7	-	-	577	21.7
Toplam	2011	100.0	652	100.0	2663	100.0

Besi ortamına ekilen embriyoların oransal olarak kombinasyonlara dağılımına bakıldığında toplam embriyo sayısı dikkate alındığında embriyoların % 31.5'i DxECD-03 kombinasyonuna aittir. Bu kombinasyonu % 27.2 ile D X ECD-02, % 21.7 ile D X ECD-04 ve % 19.6 ile D X ECD-01 kombinasyonu takip etmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Besi Ortamına Ekilen Embriyoların Kombinasyonlara Göre Oransal Dağılımı

4.6. Harnup Başına Ekilen Embriyo Oranı

Hasat edilen melez harnuplardan izole edilip besi ortamına aktarılan embriyo sayısı dikkate alınarak hazırlanan harnup başına ekilen embriyo sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6'nın incelenmesinden de anlaşılacağı gibi harnup başına ekilen embriyo sayısındaki başarı oranı deneme bazında % 937.7 olup, toplam 284 harnuptan 2663 embriyo izole edilerek besi ortamına ekilmiştir. Harnup başına embriyo ekimindeki başarı oranı kombinasyonlar bazında değerlendirildiğinde; en yüksek başarı oranı % 1254.3 ile DxECD-04 kombinasyonundan elde edilmiş olup, bu kombinasyonu % 964.0 ile DxECD-02 kombinasyonu, % 857.1 ile DxECD-03 kombinasyonu ve % 432.3 ile DxECD-01 kombinasyonu takip etmiştir.

Çizelge 4.6. Besi Ortamına Ekilen Embriyo Sayısı ile Harnup Sayısı ve Harnup Başına Ekilen Embriyo Oranına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Harnup Sayısı	Embriyo Sayısı	%	Harnup Sayısı	Embriyo Sayısı	%	Harnup Sayısı	Embriyo Sayısı	%
	I. Yıl			II. Yıl			Toplam		
D X ECD-01	26	216	830.8	39	307	787.2	65	281	432.3
D X ECD-02	36	442	1227.8	39	281	720.5	75	723	964.0
D X ECD-03	79	776	982.3	19	64	336.8	98	840	857.1
D X ECD-04	46	577	1254.3	-	-	-	46	577	1254.3
Toplam	187	2011	1075.4	97	652	672.2	284	2663	937.7

4.7. Çimlenen Embriyo Sayısı

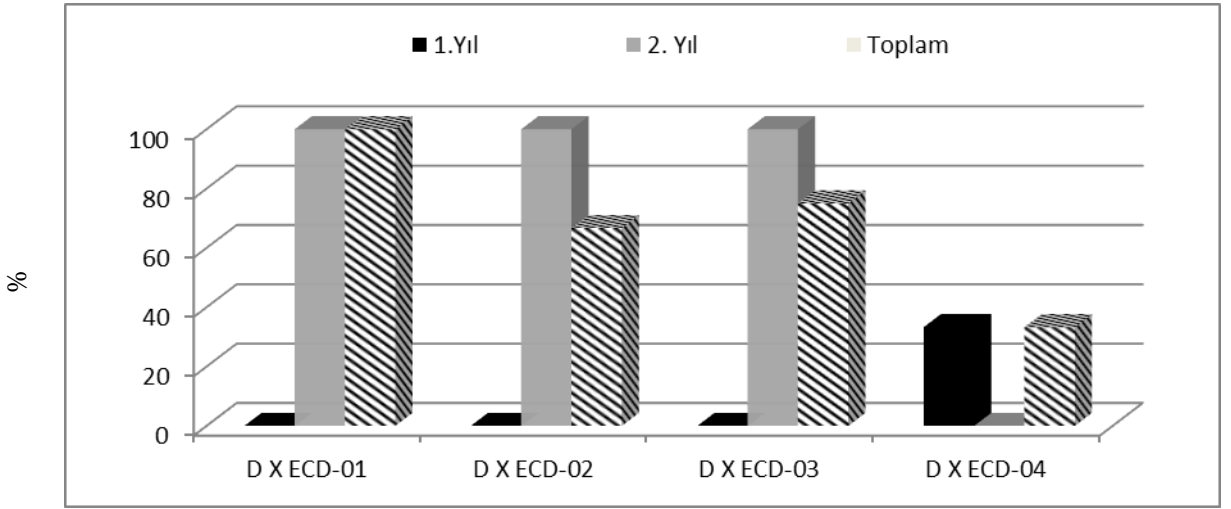
Araştırma sonucu elde edilen çimlenen embriyo sayısı, yaşatılan embriyo sayısı ve embriyo yaşama oranına ilişkin veriler Çizelge 4.7’de ve embriyo yaşama oranlarının kombinasyonlara dağılımı şekil 4.4’de, çimlenen embriyoların genel görünüşü Şekil 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.7 ve Şekil 4.4’ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi besi ortamına ekilen embriyolardan toplam 15 tanesi çimlenmiş ve bunlardan sadece 11 tanesi yaşatılabilmektedir. Dolayısıyla embriyo yaşatma oranının % 73.3 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Çimlenen Embriyo Sayısı, Yaşatılabilen Embriyo Sayısı ve Embriyo Yaşama Oranına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Çimlenen Embriyo Sayısı	Yaşatılan Embriyo Sayısı	Yaşama Oranı (%)	Çimlenen Embriyo Sayısı	Yaşatılan Embriyo Sayısı	Yaşama Oranı (%)	Çimlenen Embriyo Sayısı	Yaşatılan Embriyo Sayısı	Yaşama Oranı (%)
	I. Yıl			II. Yıl			Toplam		
D X ECD-01	0	0	0.0	5	5	100.0	5	5	100.0
D X ECD-02	1	0	0.0	2	2	100.0	3	2	66.7
D X ECD-03	1	0	0.0	3	3	100.0	4	3	75.0
D X ECD-04	3	1	33.3	-	-	-	3	1	33.3
Toplam	5	1	20.0	10	10	100.0	15	11	73.3

Besi ortamında çimlenen ve yaşatılan embriyo sayıları kombinasyon bazında değerlendirildiğinde; DxECD-01 kombinasyonundan toplam 5 embriyo çimlenmiş olup bu embriyoların tamamı, DxECD-02 kombinasyonundan toplam 3 embriyo çimlenmiş olup bu embriyoların sadece 2 tanesi yaşatılabilmektedir. DxECD-03 kombinasyonundan toplam 4 embriyo çimlenmiş olup bu embriyoların sadece 3 tanesi yaşatılabilmektedir. DxECD-04 kombinasyonundan toplam 3 embriyo çimlenmiş olup bu embriyoların sadece 1 tanesi yaşatılabilmektedir (Çizelge 4.7).

Embriyo yaşama oranlarının kombinasyonlar bazında dağılımları değerlendirildiğinde; embriyo yaşama oranının DxECD-01 kombinasyonunda % 100.0, DxECD-02 kombinasyonunda % 66.6, DxECD-03 kombinasyonunda % 75.0 ve DxECD-04 kombinasyonunda % 33.3 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7; Şekil 4.4).



Melezleme Kombinasyonları

Şekil 4.4. Embriyo Yaşama Oranlarının Melezleme Kombinasyonlarına Göre Dağılımı

4.8. Haploid Bitki Sayısı

Embriyo kültüründen sonra çimlenmelerini tamamlayan primitif bitkicikler, ilk olarak kök gelişim ortamına alınarak, hem kök hem de sürgünlerinin gelişimleri sağlanmıştır. Daha sonra alt kültüre alınarak sürgün gelişimleri sağlanmış olup, aynı zamanda bitkilerin mikro çoğaltımları da yapılmıştır. Mikro çoğaltımı tamamlanan bitkiler kök gelişim ortamına alınarak köklerinin gelişmeleri sağlanmıştır. Sap sağlamlığı dikkate alınarak iki defa kök gelişim ortamına alınmış ve burada gelişimlerini tamamlamışlardır.

a)



b)



Şekil 4.5. a) DxECD-01, b) DxECD-02 ve c) DxECD-03 Melez Kombinasyonuna Ait Çimlenen Embriyoların Genel Görünüşü

Kök ve sürgün gelişim sonrası bitki sayısı ile elde edilen haploid bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.8’de haploid bitkilerin kültür ortamında gelişmelerinin genel görüntüsü Şekil 4.6’da verilmiştir. Çizelge 4.8’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi I. yılın sonunda sürgün gelişimi sonrası DXECD-04 kombinasyonuna ait 381 bitki elde yetiştirilebilmiştir. Yetiştirilen bu bitkilerin kök gelişim ortamına aktarılmasından sonra bu ortamda da bitkilerin köklenmesi yanında kardeşlenmesi de devam etmiş ve I. yılın sonunda DXECD-04 kombinasyonuna ait toplam 401 adet haploid bitki elde yetiştirilmiştir.

I. Yıl yapılan çalışmaların sonucunda DXECD-01 kombinasyonuna ait 116 bitki, DXECD-02 kombinasyonuna ait 72 bitki ve DXECD-03 kombinasyonuna ait 36 bitki olmak üzere toplam 224 sürgün gelişmesini tamamlamıştır. Sürgün gelişmesini tamamlayan bitkilerin köklenme ortamına aktarılmasından sonra kök ve sürgün gelişmesini sürdüren bitkilerden DXECD-01 kombinasyonuna ait 196 bitki, DXECD-02 kombinasyonuna ait 106 bitki ve DXECD-03 kombinasyonuna ait 110 bitki olmak üzere toplam 412 haploid bitki elde yetiştirilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Sürgün ve Kök Gelişim Sonrası Bitki Sayısı ile Toplam Haploid Bitki Sayısına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Sürgün Gelişim Sonrası Bitki Sayısı (adet)		Kök Gelişim Sonrası Bitki Sayısı (adet)		Toplam Haploid Bitki Sayısı (adet)
	I. Yıl	II.Yıl	I. Yıl	II.Yıl	Toplam
DXECD-01	0	116	0	196	196
DXECD-02	0	72	0	106	106
DXECD-03	0	36	0	110	110
DXECD-04	381	-	401	-	401
Toplam	281	224	401	412	813

İki yıl birlikte değerlendirildiğinde; DXECD-01 kombinasyonuna ait 196 bitki, DXECD-02 kombinasyonuna ait 106 bitki, DXECD-03 kombinasyonuna ait 110 bitki ve DXECD-04 kombinasyonuna ait 401 bitki olmak üzere toplam 813 haploid bitki yetiştirilmiştir (Çizelge 4.8).



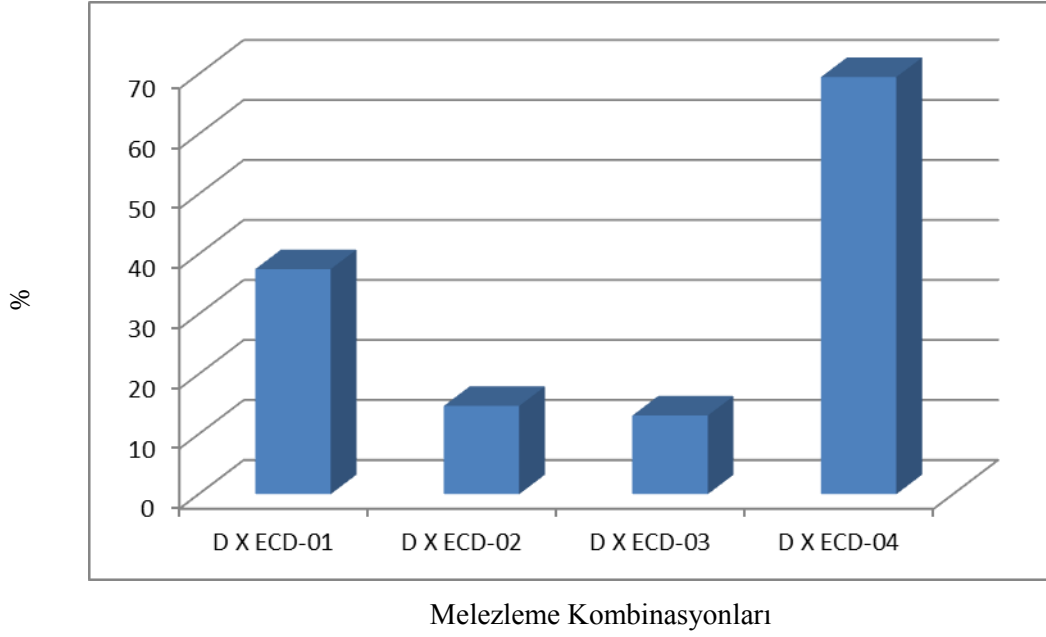
Şekil 4.6. DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Bitkilerin Genel Görünüşü

4.9. Embriyo Başına Haploid Bitki Oluşum Oranı

Besi ortamına ekilen embriyo sayısı, yetiştirilen haploid bitki sayılarına ve haploid bitki oluşumundaki başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.9’da ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7’nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi besi ortamına ekilen 2663 embriyodan toplam 813 haploid bitki elde edilmiş olup haploid bitki oluşumundaki başarı oranının % 30.5 olduğu tespit edilmiştir. Haploid bitki oluşumundaki başarı oranları kombinasyonlar bazında değerlendirildiğinde; haploid bitki oluşumundaki başarı oranının % 69.5 ile en yüksek en yüksek DxECD-04 kombinasyonunda olduğu, bu kombinasyonu % 37.5 başarı oranı ile DxECD-01 kombinasyonunun, % 14.7 ile DxECD-02 kombinasyonunun ve % 13.1 ile DxECD-03 kombinasyonunun takip ettiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Haploid Bitki Oluşumundaki Başarı Oranlarına İlişkilere Veriler

Melez Kombinasyonlar	Ekilen Embriyo Sayısı (adet)	Yetiştirilen Haploid Bitki Sayısı (adet)	Haploid Bitki Oluşumundaki Başarı Oranı (%)
D X ECD-01	523	196	37.5
D X ECD-02	723	106	14.7
D X ECD-03	840	110	13.1
D X ECD-04	577	401	69.5
Toplam	2663	813	30.5



Şekil 4.7. Haploid Bitki Oluşum Oranlarının Kombinasyonlara Göre Dağılımı

4.10. Katlamaya Alınan F1 Haploid Bitki Sayısı

Kök gelişimi yeterli olduğu görülen bitkiler katlama işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Katlamaya alınan bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.10'un incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, ilk yıl DXECD-04 melez kombinasyonundan 343 bitki katlamaya alınmıştır. İkinci yıl DXECD-01 melez kombinasyonundan 164 bitki, DXECD-02 melez kombinasyonundan 78 bitki ve DXECD-03 melez kombinasyonunun 103 bitki olmak üzere toplam 345 melez bitki katlamaya alınmıştır. İki yıl bir arada değerlendirildiğinde; DXECD-01 melez kombinasyonundan 164 bitki, DXECD-02 melez kombinasyonundan 78 bitki, DXECD-03 melez kombinasyonunun 103 bitki ve DXECD-04 melez kombinasyonundan 343 bitki olmak üzere toplam 688 bitki katlamaya alınmıştır.

Çizelge 4.10. Katlamaya Alınan F1 Haploid Bitki Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Katlamaya Alınan Bitki Sayısı (adet)		
	I. Yıl	II. Yıl	Toplam
D X ECD-01	-	164	164
D X ECD-02	-	78	78
D X ECD-03	-	103	103
D X ECD-04	343	-	343
Toplam	343	345	688

4.11. Sera Koşullarında Yetiştirilen Double Haploid F1 Bitki Sayısı

Katlaması yapılan bitkiler karışım ihtiva eden saksılara gelişimlerini sürdürmeleri için şaşırtılmış ve 1 hafta süreyle laboratuvar koşullarında akklimatize edildikten sonra gelişimlerini sürdürmeleri için sera koşullarına aktarılmışlardır. Sera koşullarında gelişmesini sürdüren double haploid F1 bitkilerine ilişkin veriler Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi ilk yıl, DXECD-04 melez kombinasyonuna ait 284 bitki ve ikinci yıl DXECD-01 melez kombinasyonundan 30 bitki, DXECD-02 melez kombinasyonundan 17 bitki ve DXECD-03 melez kombinasyonundan 17 bitki olmak üzere toplam 64 bitki sera koşullarına taşınmış ve gelişimlerini sürdürmüşlerdir. İki yıl bir arada değerlendirildiğinde ilk yıl 284 bitki ve ikinci yıl 64 bitki olmak üzere toplam 348 bitki sera koşullarına aktarılmış ve sera koşullarında gelişmesini sürdürmüşlerdir.

Çizelge 4.11. Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Sera Koşullarına Aktarılan Bitki Sayısı (adet)		
	I. Yıl	II. Yıl	Toplam
D X ECD-01	-	30	30
D X ECD-02	-	17	17
D X ECD-03	-	17	17
D X ECD-04	284	-	284
Toplam	284	64	348

4.12. Katlamada Başarı Oranı

Katlamaya alınan haploid bitki sayısı, sera koşullarına aktarılan bitki sayısı ve katlamada başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çizelge 4.12’nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi katlamaya alınan 668 bitkiden sadece 348 bitki sağlıklı olarak sera koşullarına aktarılmış olup katlamadaki başarı % 50.6 olduğu belirlenmiştir. Katlamadaki başarı oranları kombinasyonlar bazında değerlendirildiğinde; en yüksek başarı oranı % 82.8 ile DxECD-04 melez kombinasyonundan elde edilirken, bu kombinasyonu % 21.8 ile DxECD-02, % 18.3 ile DxECD-01 ve % 16.5 ile DxECD-03 kombinasyonu takip etmiştir.

Çizelge 4.12. Katlamaya Alınan Bitki Sayısı, Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayısı ve Katlamada Başarı Oranlarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Katlamaya Alınan Bitki Sayısı (adet)	Sera Koşullarına Aktarılan Bitki Sayısı (adet)	Katlamada Başarı Oranı (%)
D X ECD-01	164	30	18.3
D X ECD-02	78	17	21.8
D X ECD-03	103	17	16.5
D X ECD-04	343	284	82.8
Toplam	688	348	50.6

4.13. İklimlendirme Ünitesine Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayısı

Sera koşullarında gelişmesini belirli bir aşamaya kadar sürdüren bitkiler vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması için iklimlendirme ünitesine alınarak +4° C’de 3 ay süreyle bekletilmişlerdir. İklimlendirme ünitesine alınarak vernalizasyona tabi olacak bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.13’de verilmiştir. Çizelge 4.13’ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi vernalizasyona sadece DXECD-04 melez kombinasyonundan 263 bitki alınabilmiş olup, diğer kombinasyonlara ait bitkiler sera koşullarında yaşatılamamışlardır.

Çizelge 4.13. Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayısı (adet)
DXECD-01	-
DXECD-02	-
DXECD-03	-
DXECD-04	263
Toplam	263

4.14. Vernalize Edilmiş Double Haploid F1 Bitki Sayısı

Vernalizasyon ihtiyacını tamamlayan bitkiler iklimlendirme odasından çıkarılmış ve tekrar çiçeklenmeleri ve gelişmelerini tamamlamaları için sera koşullarına aktarılmışlardır. Sera koşullarına aktarılan vernalize edilmiş double haploid F1 bitlerine ait veriler Çizelge 4.14’de verilmiştir. Çizelge 4.14’ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, DXECD-04 melez kombinasyonuna ait 162 melez bitki vernalizasyon sonrası gelişmelerini tamamlamaları amacıyla tekrar sera koşullarına aktarılmışlardır.

Çizelge 4.14. Vernalize Edilip Sera Koşullarına Aktarılan Double-Haploid F1 Bitkilerine Ait Veriler

Melez Kombinasyonlar	Vernalize Edilip Sera Koşullarına Aktarılan Double Haploid F1 Bitki Sayısı (adet)
DXECD-01	-
DXECD-02	-
DXECD-03	-
DXECD-04	162
Toplam	162

4.15. Vernalizasyondaki Başarı Oranı

Vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla iklimlendirme ünitesine aktarılan bitkileri, vernalizasyonunu başarıyla tamamlayarak gelişmelerini tamamlamaları için tekrar sera koşullarına aktarılan bitki sayısı ve vernalizasyondaki başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 4.15’de verilmiştir. Çizelge 4.15’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, vernalizasyondan sonra, sera koşullarında yaşatılabilen sadece DXECD-04 melez kombinasyonlara ait toplam 263 bitki alınmış olup, bu bitkilerden sadece 162 tanesi vernalizasyon ortamında yaşatılabilmiş ve vernalizasyonunu tamamlayarak yeniden sera koşullarına aktarılmışlardır. Dolayısıyla vernalizasyondaki başarı oranının % 61.6 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.15. Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayısı, Vernalizasyondan Çıkan Bitki Sayı ve Vernalizasyondaki Başarı Oranlarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Vernalizasyona Aktarılan Bitki Sayısı (adet)	Vernalizasyondan Çıkan Bitki Sayısı (adet)	Vernalizasyondaki Başarı Oranı (%)
DXECD-01	-	-	-
DXECD-02	-	-	-
DXECD-03	-	-	-
DXECD-04			
Toplam	263	162	61.6

4.16. Double Haploid F1 Bitkilerinden Hasat Edilen Tohum Sayısı

Sera koşullarında kendilemeler yapıldıktan sonra tohumların hasadı fizyolojik olgunluğa ulaştıkları dönemde yapılmıştır. Hasat edilen melez kombinasyonlara ait tohum sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.16’da verilmiştir. Çizelge 4.16’nın incelenmesinden de anlaşılacağı

gibi, kendileme sonrası fizyolojik olgunluğunu tamamlamış olan DXECD-04 melez kombinasyonuna ait 8 melez bitkisinden toplam 148 harnup hasadı yapılmış olup, harnupların harmanı sonrası bu melez bitkilere ait toplam 293 tohum elde edilmiştir. Bu verilerin değerlendirilmesi sonucu harnup başına ortalama tohum sayısının 2 adet olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Kendileme Sonrası Tutan Harnup ve Tohum Sayılarına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Melez No	Harnup Sayısı	Tohum Sayısı	Harnup Başına tohum Sayısı (adet)
DXECD-04	1.Melez	3	14	4.67
DXECD-04	2.Melez	4	17	4.25
DXECD-04	3.Melez	64	115	1.80
DXECD-04	4.Melez	37	83	2.24
DXECD-04	5.Melez	24	36	1.50
DXECD-04	6.Melez	5	10	2.0
DXECD-04	7.Melez	7	11	1.57
DXECD-04	8.Melez	4	7	1.75
Toplam		148	293	1,97

4.17. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesi İçin Yetiştirilen Double Haploid F2 Bitki Sayısı

Hastalık testlemesini daha etkin ve sağlıklı yürütmek amacıyla testlemede kullanılacak double haploid melez bitkilerin ve kontrol çeşidinin (Dürme) tohumlarının ekimi, 5 farklı ekim zamanında, in vitro koşullarda ve 1 kg kapasiteye sahip cam kavonozlar yapılmış olup, yetiştirilen double haploid melez bitki sayısı, ekim zamanları ve toplam bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.17’de verilmiştir. Çizelge 4.17’nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi 8 melez kombinasyona ait toplam 210 double haploid bitki yetiştirilmiştir. Yetiştirilen double haploid bitkilerin ait oldukları melez kombinasyonlara göre dağılımına bakıldığında; 1. Melez bitkiden orijin alan 11, 2. Melez bitkiden orijin alan 15, 3. Melez bitkiden orijin alan 70, 4. Melez bitkiden orijin alan 60, 5. Melez bitkiden orijin alan 30, 6. Melez bitkiden orijin alan 8, 7. Melez bitkiden orijin alan 9 ve 8. Melez bitkiden orijin alan 7 double haploid melez bitki yetiştirilmiştir.

Ekim zamanlarına göre hastalık testlemesine tabi tutulacak bitki sayıları değerlendirildiğinde; 1. ekim zamanında 38 tohum, 2. ekim zamanında 40 tohum, 3. ekim

zamanında 45 tohum, 4. ekim zamanında 40 tohum ve 5. ekim zamanında 47 tohum olmak üzere toplam 215 double haploid melez bitki yetiştirilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Testleme İçin Yetiştirilen Double Haploid Bitkilere İlişkin Veriler.

Melezler	1. Ekim Zamanı	2.Ekim Zamanı	3.Ekim Zamanı	4.Ekim Zamanı	5.Ekim Zamanı	Genel Toplamı
1.Melez	4	4	3	-	-	11
2.Melez	4	4	4	-	3	15
3.Melez	10	10	15	20	15	70
4.Melez	10	10	15	10	15	60
5.Melez	10	5	5	5	5	30
6.Melez	-	-	3	3	2	8
7.Melez	-	5	-	2	2	9
8.Melez	-	2	-	-	5	7
Toplam	38	40	45	40	47	210

4.18. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesine Alınan F2 Double Haploid Bitki Sayısı

Testlemeye alınan bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.18’de verilmiştir. Çizelge 4.18’in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi testlemeye alınan DXECD-04 kombinasyonuna ait 8 melez bitkiden orijin alan toplam 108 bitki testlemeye tabi tutulmuşlardır. Testlemeye alınan bitkiler dikkate alınarak değerlendirildiğinde; 1. Melezden 10, 2. Melezden 5, 3. Melezden 17, 4. Melezden 35, 5. Melezden 14, 6. Melezden 4, 7 Melezden 4 ve 8. Melezden 4 bitki olmak üzere toplam 108 bitki testlemeye tabi tutulmuştur.

4.19. Lahana Kök Uru Hastalığına Dayanıklılık Testlemesi Sonrası Yaşamını Sürdüren Double Haploid F2 Bitki Sayısı

Testleme süresi dolan bitkiler laboratuvar ortamına getirilmiştir. Aliminyum folyosu açılan bitkilerin kökleri musluk suyunda yıkanmıştır. Daha sonra köklerde ur olup olmadığı incelenerek hastalık okuması yapılmıştır. Testleme sonrası bitki sayılarına ilişkin veriler Çizelge 4.19 ve testleme sonrası bitkilerin kök bölgesi ağırlıklı olmak üzere genel görünüşleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Çizelge 4.19’un incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, testlemeye alınan ve yaşamını sürdüren 33 adet double haploid melez bitkinin hastalık belirtisi urlaşma yapısına sahip olmadığı dolayısıyla hastalık indeksinin 0 olduğu tespit edilmiştir. İlave olarak testlemeye alınan kontrol bitkilerinde yapılan hastalık okumalarında

hastalık indeksinin 3 olduğu dolayısıyla bütün kontrol bitkilerinin hassas olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. Testlemeye Alınan Double Haploid Bitki Sayılarına İlişkin Veriler

Melezler	1. Ekim Zamanı	2.Ekim Zamanı	3.Ekim Zamanı	4.Ekim Zamanı	5.Ekim Zamanı	Genel Toplamı
1.Melez	4	4	2	-	-	10
2.Melez	4	1	-	-	-	5
3.Melez	10	-	1	-	6	17
4.Melez	10	5	10	-	10	35
5.Melez	10	-	2	-	2	14
6.Melez	-	-	3	-	1	4
7.Melez	-	2	-	-	2	4
8.Melez	-	-	1	-	3	4
Toplam	38	12	19	0	26	95
Kontrol	-	5	5	0	5	15
Genel Toplam	38	17	24	0	29	108

Çizelge 4.19. Testleme Sonrası Hastalık Okumasına İlişkin Veriler

Melez Kombinasyonlar	Testleme Yapılan Bitki Sayısı	Hastalık Index	Reaksiyon Kategorisi
DxECD-4 1.Melez	1	1	D=0 Dayanıklı
DxECD-4 2.Melez	2	1	D=0 Dayanıklı
		2	D=0 Dayanıklı
DxECD-4 3.Melez	5	1	D=0 Dayanıklı
		2	D=0 Dayanıklı
		3	D=0 Dayanıklı
		4	D=0 Dayanıklı
		5	D=0 Dayanıklı
DxECD-4 4.Melez		1	D=0 Dayanıklı
		2	D=0 Dayanıklı
		3	D=0 Dayanıklı
		4	D=0 Dayanıklı
		5	D=0 Dayanıklı
		6	D=0 Dayanıklı

	11	7	D=0	Dayanıklı
		8	D=0	Dayanıklı
		9	D=0	Dayanıklı
		10	D=0	Dayanıklı
		11	D=0	Dayanıklı
DxECD-4 5.Melez	5	1	D=0	Dayanıklı
		2	D=0	Dayanıklı
		3	D=0	Dayanıklı
		4	D=0	Dayanıklı
		5	D=0	Dayanıklı
DxECD-4 6.Melez	2	1	D=0	Dayanıklı
		2	D=0	Dayanıklı
DxECD-4 7.Melez	1	1	D=0	Dayanıklı
DxECD-4 8.Melez	4	1	D=0	Dayanıklı
		2	D=0	Dayanıklı
		3	D=0	Dayanıklı
		4	D=0	Dayanıklı
Toplam	33			
Kontrol –Dürme	5	1	D=3	Hassas
		2	D=3	Hassas
		3	D=3	Hassas
		4	D=3	Hassas
		5	D=3	Hassas

Brassica familyasında yer alan birçok bitki son yıllarda bitki hücre ve biyoteknolojisi alanında yapılan hem uygulamalı hem de temel araştırmalara konu olmuştur. Biyoteknolojinin bitki ıslahı çalışmalarında kullanılması ile ıslah programlarının geliştirilmesi ve seleksiyonun etkinliğinin artırılması mümkün olabilir. Nitekim bu durum birçok yağ bitkisinde yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Friedt, 1990).

Brassica türlerinde geliştirilen doku kültürü teknikleri esas olarak somatik melezleme ve somaklonal varyasyon yolu ile *brassica* familyasında yer alan bitki çeşitlerine yağ kalitesinin artırılması, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, herbisitlere dayanıklılık vb. gibi değerli ve uygun yeni özelliklerin aktarılmasını amaçlamaktadır (Basiran ve diğ., 1987).

Türlerarası melezlemelerden fertil döllerin elde edilmesine yönelik olarak bugüne kadar, birçok teknik kullanılmış ve halen de kullanılmaya devam etmektedir. Bu araştırmada

da embriyo kültür tekniği kullanılarak lahana kök ur hastalığına karşı dayanıklı topbaş lahana hatlarının geliştirilmesinde embriyo kültür tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla önce lahana kök ur hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıyan şalgam hatları ile kök ur hastalığına hassas lahana çeşidi sera koşullarında melezlenmiştir. Bu melezlemelerden elde edilen primitif embriyolar besi ortamında kültüre alınıp haploid bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen haploid bitkilerin kromozomlarının katlanması ile de double haploid bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen double haploid melez bitkiler sera koşullarında kendilendikten sonra elde edilen tohumlar ekilip yetiştirilen fideler kök ur hastalığı yönünden test edilmişlerdir.

B. oleracea L., $2n= 18$ kromozoma ve C genomuna ve *B. Rapa* L. ise $2n= 20$ kromozoma ve A genomuna sahiptir. Bu iki tür arasında melezleme yapıldığında fertil döllerin elde edilme şansı genetik olarak sıfırdır. Zira F1 generasyonunda elde edilecek bitkiler haploid olup, kromozom sayıları $19 (n+n=10+9)$ ve genomları AC şeklindedir. Dolayısıyla hücre bölünmesi esnasında gametlerin eşlerini bularak eş oluşturma (eşleşme) şansı yoktur ve oluşacak olan dölleri kısırdır. Ayrıca türler arasındaki melezlemelerde fertil döl elde etme şansının; dokusal uyumun ve akrabalık seviyesinin artması ile arttığı, azalması ile de azaldığı (Kurt, 2004b), farklı genotipler arasında yapılacak melezlemelerde, melez dölleri elde etme bakımından en önemli faktörün hücrel ve dokusal uyum durumu (Demir, 2005) olduğu bilinmektedir.

Yapılan araştırmalar sonucu; farklı genom ve kromozom sayısına sahip türler arasında melezlemeler yapılarak oluşturulan primitif embriyoların belirli bir fizyolojik olgunluk dönemini geçirmeden, besi ortamında kültüre alınmaları (embriyo kurtarma tekniği) durumunda, bitki cins ve türüne de bağlı olmak üzere, düşük frekansta da olsa fertil döllerin elde edilme şansının olduğu ortaya konmuştur (Kurt ve diğ., 2010). Brassica türleri arasında yapılan melezlemelerden yeni hat ve çeşitlerin geliştirilmesinde, bu bulgular başarıyla kullanılmıştır (Morinaga, 1934; Song ve diğ., 1993). Örneğin *Brassica napus*'un erken dönemdeki embriyolarının kültüründe, $30 \mu\text{m}$ 'den daha küçük embriyoların kültüre alınması halinde sağlıklı embriyo gelişiminin olmadığı, 30 ile $50 \mu\text{m}$ arasında olan embriyoların kültüründe % 3,7 ve $50 \mu\text{m}$ 'den daha büyük embriyoların kültüründe embriyo başına % 28,9 fide oluşumunun elde edildiği (Goralski ve diğ., 1998), *B. napus* \times *B. juncea* melezinde 10 ve 15 günlük embriyoların kültüründe; 10 günlük embriyoların kallus oluşturarak daha yüksek başarı gösterdiğini, ancak 15 günlük embriyolarda ise; yüzde olarak daha fazla bitki oluşumu gözlemlendiği rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2003). Brassica dışında bazı bitkilerde yapılan çalışmalardan da başarı açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin nohutta tozlanmadan itibaren $6, 8, 10$ ve 12 . günlerde kültüre alınan embriyoların arasından 6 günlük embriyoların hiçbirisi çimlenme elde edilememesine karşılık çimlenme bakımından 8 ve 10

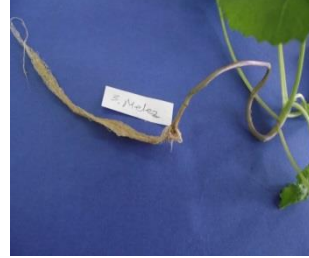
günlük embriyoların daha iyi sonuç verdiği (Malikarjuna, 1999), buğday ve çavdar melezlemesi sonucu 13-21 günlük embriyoların kültüründe ise en iyi sonucun 15-17 günlük embriyoların kültüründen elde edildiği rapor edilmiştir (Sirkka ve Immonen; 2004).



2.Ekim 1.Melez Kök- Ursuz



2.Ekim 9. Melez Kök-Ursuz



3.Ekim 3.Melez Kök-Ursuz



3.Ekim 4. Melez Kök-Ursuz



3. Ekim 5.Melez Kök-Ursuz



3. Ekim 7.Melez Kök-Ursuz



5. Ekim 3. Melez Kök- Ursuz



5.Ekim 5.Melez Kök-Ursuz



5.Ekim 8.Melez Kök-Ursuz



Kontrol Dürme Kök-Urlu



Kontrol Dürme Kök-Urlu



Kontrol Dürme Kök-Urlu

Şekil 4.8. DXECD-04 Melez Kombinasyonuna Ait Bazı Bitkilerin ve Kontrol (Dürme) Çeşidinin Testleme Sonrası Kök Uru Hastalığına İlişkin Genel Görüntüler

Bu araştırmada; 4 şalgam hattı ve 1 lahana çeşidi arasında 4 kombinasyonu (DürmexECD-01, DürmexECD-01, DürmexECD-01 ve DürmexECD-01) kapsamayacak biçimde melezleme yapmak amacıyla 831 adet iek tozlanmıştır. Bitkilerin melezlenmesinde başarı oranı; yetiştirme tekniği paketi uygulamalarına, çevresel faktörlere ve genotipe bağlı olarak değişir. Bu nedenle bu araştırmada kullanılan hatların genetik olarak sahip oldukları zorluklar göz önünde bulundurularak evre faktörleri optimal düzeyde tutulması için bitkiler, sıcaklık ve fotoperiyot bakımından kontrollü sera koşullarında yetiştirilerek, evre koşullarının etkisi minimize edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca yetiştirme tekniği paketi uygulamaları da tüm çeşitlere eşit olarak uygulanmıştır.

Bu araştırmada embriyo kültürü yapmak üzere fizyolojik olgunluğu (fizyolojik yaşı) 10-15 gün olan 2663 adet tohum taslağı, besi ortamına aktarılmıştır. Besi ortamına aktarılan tohum taslaklarından bitkiciklerin oluşması, hiç şüphesiz ki birinci derecede genotip faktörüne bağlıdır. Bu araştırmada besi ortamına ekilen tohum taslaklarının şalgam ve lahana melez kombinasyonuna ait olması yani bu iki türün özelliğini bünyesinde barındırıyor olması, bitkicik oluşumundaki başarı üzerine hem olumlu hem de olumsuz etki etmiş olabilir. Örneğin; melezlenen iki *Brassica* türünün responsu yüksek ise muhtemelen bitkicik oluşumundaki başarı oranı da yüksek olacaktır. Nitekim daha önce yapılan bir araştırmada *B. napus* L. ve *B. juncea* L. arasındaki melezlemeden oluşan melez döl besi ortamında kültüre alındığında (embriyo kültürü yapıldığında) bitkicik oluşum oranının % 50 gibi oldukça yüksek bir değerde gerçekleştiği, bunda da bu türlerin responslarının yüksek olmasının etkili olduğu rapor edilmiştir (Bajaj ve diğ., 1986). Araştırmada ele alınan *Brassica* türlerinin her ikisinin de bitkicik oluşturma yetenekleri düşük ise muhtemelen bunların melezlenmesi sonucu oluşan döllerin embriyo kültürü yapılması halinde, bitkicik oluşumundaki başarı oranı da düşük olacaktır. Ayrıca düşük responsa sahip bir türün, yüksek responsa sahip diğer bir türün responsunu nötrale etme durumu da her zaman mümkündür. Diğer taraftan ele alınan *Brassica* türlerinin bitkicik oluşturma yeteneklerinin önceden bilinmesi de (üzerinde daha önce çalışma yapılmamış ise) mümkün değildir. Dolayısıyla bu tür çalışmalarda mümkün olduğunca çok sayıda embriyonun besi ortamında kültüre alınması (embriyo kültürü yapılması), bitkicik oluşum oranının artmasına yardımcı olabilir.

Embriyo kültüründe ana hedef maksimum sayıda sağlıklı ve fertil bitkiler elde etmektir. şalgam ve lahana hatları arasında yapılan melezlemelerden oluşan melez harnuplardaki tohum taslaklarından toplam 813 adet hapoid melez bitki elde edilmiştir. Besi ortamına ekilen embriyo başına bitki oluşum oranı % 30.5 gibi oldukça yüksek bir oranda gerçekleşmiştir (izelge 4.9). Elde edilen bu bulgu; literatür bulgularıyla uyumludur. Bu araştırmada elde edilen bu bulgu; bu yönde yapılacak daha sonraki araştırmalar için de bir model olarak kullanılabilir. Elde edilen bu sonuç üzerine birinci derecede genotip faktörünün rol oynadığını söylemek yanlış olmaz. Kültüre alınan embriyoların rejenerasyon

yeteneği üzerine, genotipin etkili olduğunu daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Hanzel ve diğ., 1985). Embriyo kültüründe, elde edilen bitki bakımından başarı üzerine genotip etkisinin farklı olduğu (Can ve diğ., 2000), genotiplerin somatik embriyo üretim kapasitesi açısından farklılık arz ettikleri ve yüksek embriyogenik kapasiteli genotiplerde, bitkiye dönüşüm oranının da yüksek olduğu saptanmıştır (Brown ve Atanasov, 1985). Genotip faktörünün yanı sıra kullanılan besi ortamının da embriyoların bitkiye dönüşümüne önemli derecede etki etkili olduğunu söylemek mümkündür.

Bu araştırmada; *B. oleracea* ile *B. rapa* arasında yapılan melezlemelerden oluşan 33 double haploid kendilenmiş ve hastalık testlerinden geçmiş 15 bitki halen sera koşullarında gelişmelerini sürdürmektedir.

B. oleracea L. ile *B. rapa* L. arasında yapılan melezlemelerden oluşan haploid bitkilerin in vitro koşullardan çıktıktan sonra kolhisin ile muamele edilmeleri sayesinde AC şeklinde (amphihaploid) olan genomlarının AACC (amphidiploid) şekline ulaşması sayesinde tohum bağladıkları dolayısıyla bu tohumların bünyelerinde şalgam ve lahanaya genomlarını taşıdıklarını söylemek yanlış olmaz. Nitekim melez bitkilerin morfolojik yapıları incelendiğinde; lahanaya gibi uzun ve dik saplı ve seyrek boğum arasına, şalgam gibi yaprak kenarlarının dişli, yaprak yüzeyinin tüylü, yaprakların sert olduğu anlaşılmaktadır. Birçok seleksiyon ıslah çalışmasında bu tip karakterlerin göz önünde bulundurulması sayesinde bitki çeşitleri geliştirilmiş ve son aşama olarak da diğer analitik analizler yapılmıştır. Dolayısıyla da geleneksel yöntemlerle kombine edilen embriyo kültür tekniği, en azından bu proje kapsamında, lahanaya kök ur hastalığına karşı dayanıklı melez bitkilerden oluşan bir gen havuzunun elde edilmesini sağlamıştır diyebiliriz.

Lahanaya (*B. oleracea* L.) ve şalgam (*B. rapa* L.) türleri arasında yapılan melezlemelerden elde edilen melez kombinasyonlara ait bitkiler sera koşullarında kendilenecek DürmexECD-4 kombinasyona ait toplam 8 melez bitkiden tohum hasadı yapılarak, 293 tohumdan oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur (Çizelge 4.16).

Oluşturulan gen havuzundaki tohumların, kök ur hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıyıp-taşımadıklarını belirlemek amacıyla ters yapılmış ve bu tohumların ekilmesinden elde edilen 33 double haploid kendilenmiş fidenin kök ur hastalığına karşı dayanıklılık genleri taşıdıkları belirlenmiştir. Teorik olarak da değerlendirildiğinde; bu iki tür arasında yapılacak melezlemeden elde edilen bitkilerin kromozomlarının katlanması ile oluşan bitkiden tohum hasadı yapılması durumunda bu tohumların genetik yapısı her iki türün arasında bir değere sahiptir. Bu nedenle hasat edilen tohumlardan oluşan bitkiler; Mendel prensiplerine göre belirli oranda dayanıklılık genlerini taşımış olacaklardır. Diğer taraftan şalgam ve lahanaya türlerinin genomlarının ve kromozom sayılarının farklı olması, fertil döllerin ortaya çıkması durumunda bir ayıraç gibi kendilerini fenolojik olarak ortaya koymaları (melez bitkiler morfolojik olarak lahananın boy ve yaprak ayası genişliği özelliklerini yansıması yanında

şalgamın tüylü ve sert yaprak özelliklerini taşımaktadırlar), gen havuzundaki bitkilerin lahana kök ur hastalığına karşı dayanıklılık taşıyabileceği ön görüşünü de desteklemektedir.

Kök ur hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıdığı düşünülen tohumların ekilmesiyle elde edilen fidelerin hastalık etmenleri ile bulaştırılarak hastalık testlemesine tabi tutulması sonucu toplam 33 bitkinin hastalık etmenlerini taşımadıkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Melezlemelerde Mendel kuralları dikkate alındığında bu durum aslında beklenen bir sonuçtur.

Yapılan bu çalışma bir model çalışma olup, *Brassica*'larda kök ur hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıyan genotiplerden oluşan bir gen havuzu oluşturmada embriyo kültür tekniğinin potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef tam olarak gerçekleştirilmiş olup, bu tez araştırması ile arzu edilen gen havuzu oluşturulmuş olup, ileriye yönelik araştırmalar için de genetik materyal ortaya konmuştur. Ayrıca bu araştırmadan elde edilen bulgular kullanılarak ileride, farklı amaçlarla, *brassica* türleri arasında yapılacak türlerarasındaki melezlemelerde, bu araştırmada ortaya konan yöntemler kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilebilir. İlave olarak diğer bitkilere (özellikle dikotiledon bitkilerde) de bu sistem adapte edilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma; *Brassica* türleri arasında melezlemeler yaparak lahana kök ur hastalığına dayanıklı hatlarının geliştirilmesinde embriyo kültür tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde, iklimlendirme ünitesinde, doku kültür odasında, serada ve tarla koşullarında yürütülmüştür.

Lahana (*B. oleracea* L.) ve şalgam (*B. rapa* L.) türleri içinde yer alan Dürme lahana çeşidi ile ECD-1, ECD-2, ECD-3 ve ECD-4 şalgam hatlar arasında, sera koşullarında 831 çiçek tomurcuğu melezlenmiştir. Bu melezlemelerden oluşan toplam 284 adet harnuptan toplam 2663 adet primitif embriyo besi ortamına aktarılmıştır. Besi ortamına aktarılan embriyolardan toplam 15 adet embriyo yaşatılmış ve bunlardan toplam 813 adet haploid bitki elde edilmiştir. Embriyo başına haploid bitki oluşum oranının % 30.5 olduğu saptanmıştır.

Elde edilen haploid bitkilerden toplam 688 bitki katlamaya alınmış olup, katlama sonrası 348 sağlıklı double haploid bitki sera koşullarına aktarılmış olup bu bitkilerden gelişmelerini tamamlayabilen toplam 263 double haploid bitki vernalizasyona alınmıştır.

Vernalizasyona alınan double haploid bitkilerden toplam 162 adet double haploid bitki sağlıklı olarak sera koşullarına aktarılmış olup bu bitkilerden çiçeklenme periyoduna gelen bitkilerde yapılan kendilemeler sonucunda sadece DurmexECD-4 melez kombinasyonuna ait toplam 8 melez bitkiden toplam 148 harnup ve bu harnupların harman edilmesi sonucu toplam 293 adet tohumdan oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur.

Oluşturulan gen havuzundaki tohumlar, testlemek amacıyla steril koşullarda ekilerek toplam 210 adet double haploid kendilenmiş bitki yetiştirilmiş ancak bu bitkilerden sadece 95 tanesinde testleme yapılabilmektedir. Testlemeye tabi tutulan bu bitkilerden sadece 33 tanesinde hastalık kaydı yapılabilmektedir. Böylece lahana kök ur hastalığına karşı dayanıklılık geni taşıyan 33 double haploid kendilenmiş bitkiden oluşan bir gen havuzu oluşturulmuştur.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara dayanarak aşağıdaki öneriler yapılabilir.

1) Melezleme dönemi yeterli sayıda çiçek bulabilmek için çiçeklenme periyodunu geniş zamana yaymaya olanak sağlayan çoklu ekim sisteminin uygulanması önerilebilir.

2) Lahana (*B. oleracea* L.) çeşidi ve şalgam (*B. rapa* L.) hatları arasında yapılan türlerarası melezlemelerden sağlıklı ve fertil bitki elde etme bakımından embriyo kültürünün kullanılması önerilebilir.

3) *Brassica* türleri arasında yapılacak türlerarası melezlemeler sonucu oluşan primitif embriyoların kültürü için oldukça yüksek bitki oluşum oranının elde edildiği MS5519 besi ortamı, sürgün gelişimi için 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l BAP ihtiva eden MSD4 besi ortamı ve köklendirme ortamı olarak 1 mg/l IAA ihtiva eden MSD4 besi ortamının kullanılması önerilebilir.

4) Haploid bitkilerin katlanması için bitkilerin % 0,5'lik kolhisin çözeltisinde, 1 gece, oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda tutulması önerilebilir.

5) Vernalizasyon ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla iklimlendirme ünitesine aktarılacak bitkilerin rozet dönemini (8-11 yapraklı) geçirdikten sonra aktarılmaları önerilebilir.

6) Kendime sonrası sağlıklı harnup ve yeterli tohum oluşumu bakımından sera koşullarının düzenlenerek ortam sıcaklığının oda sıcaklığı civarında tutulması önerilebilir.

7) Hastalık gelişiminin yoğun olduğu toprak pH'sının 4-6 arasında olan toprak şartlarında testlemenin yapılması önerilebilir.

8) Lahana kök ur hastalığına karşı dayanıklılık genleri taşıyan 33 bitkiden oluşan gen havuzu, lahana kök ur hastalığına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla hazırlanacak olan yeni projelerde materyal olarak kullanılması önerilebilir.

8) Bu çalışmada kullanılan metotlar, diğer bitkilerde de türlerarası melezlemelerde model olarak alınabilir.

KAYNAKLAR

- Angios, G.N., 2004. Plant diseases caused by fungus. Plant pathology university of massachusetts Pages 288-291
- Anonymous, 1993. Sigma cell culture reagents. Plant Cell Culture. MS5519 (Murashige and Skoog, 1962). Sigma chemical company, Sigma chemical co. Ltd. Printed in the USA. Pages. 113.
- Anonymous, 1994. Tarımsal yapı ve üretim. Devlet İstatistik Enstitüsü yayınları.
- Anonymous, 1995. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. Cilt 2. Ankara.
- Anonymous, 2000. *Plasmodiophora brassicae*. Danish environmental protection agency webcite. (http://www.mst.dk/default.asp?Sub=http://www.mst.dk/udvig/publications/2000/87-7944-286-2/html/kap03_eng.htm)
- Anonymous, 2005. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2005 Yılı Bitki Koruma Programı ve Uygulama Prensipleri. Ankara.
- Anonuyous, 2009. Sebzelerin beslenme ve sağlık açısından önemi ve değerlendirilmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. Genel Sebzeçilik Ders Notları
- Anonymous, 2011. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Brassica&oldid>
- Anonymous, 2013. <http://www.fao.org/statistics/databases/en/>.
- Anonymous, 2014. Lahana kök-uru hastalığı. Tarım ve Ziraat Bilgi Bankası. Tarım Ziraat.com.
- Anonymous, 2014. Tarımsal yapı ve üretim. Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları.
- Apaydın, A., Deligöz, İ., Kar, H., Kibar, B., Karaağaç, O., 2010. An investigation on clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) Races in the black sea region of Turkey GOÜ, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, 27(2), 57-60
- Argun, N., Şahin, Ö., 2006. Ökse otu ile mücadele. <http://www.cigdemim.org.tr/etkinlikler/okseotu.0502.html>. Erişim Tarihi: 25.05.2006.
- Asano, T., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 1999. Surface disinfestation of resting spores of *P. brassicae* used to infect hairy roots of *Brassica Spp*. Publication No: P-1999-0208-02r. 1999. *The American Phytopathological Society*. Vol.89, No.4.

- Bajaj, Y. P. S., 1990. Wide hybridization in legumes and oilseed crops through embryo, ovule and ovary culture. In. Bajaj Y. P. S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 10, Legumes and Oilseed Crops I. Springer, Berlin. Heidelberg New York, pp 3-37.
- Bajaj, Y. P. S., Kumar, P., Labhana, K. S., 1982. Interspecific hybridization in the genus *Arachis* through embryo culture. *Euphytica* 31:365-370.
- Bajaj, Y. P. S., Mahagan, S. K. and Labana, K. S., 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea* through ovary, ovule and embriyo. Biomedical and life sciences. *Euphytica* Vol. 35 (1):103-109.
- Basiran, N., Armitage, P., Scoot, R. J., Draper, J., 1987. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) by *agrobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell. Rep.* 6:396-399.
- Başal, H., 2002. Gossypollu bitki gossypolsuz tohum özelliğinin kültürü yapılan pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) türlerine aktarılması. MKU Ziraat Fakültesi Dergisi 7(1-2): 45-50. http://www.mku.edu.tr/ziraat_dergi/2002/H.Basal-pamuk.pdf. (Erişim Tarihi: 24.09.2005).
- Bauchan, G.R., 1987. Embryo culture of *Medicago scutellata* and *M. sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10:21-29.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1996. Plant tissue culture. Theory and practise, Revised edition, pp.297-335, Elsevier Science, Amsterdam.
- Birsin, M., A., Önde, S. and Özgen, M., 2001. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.). *Turk J. Biol.* 25:427-434. TUBİTAK.
- Brown, D.C.W ve Atanassov, A., 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:111-122.
- Bürün, B. ve Gürel, A., 2001. Embriyo kültürü. Bitki biyoteknolojisi I Doku kültür ve uygulamaları (2. Baskı). (Ed.) Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 324-342.
- Bürün, B. ve Poyrazoğlu, E. Ç., 2002. Embryo culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Turk J. Biol.*, 26:175-180. TUBİTAK.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., Eskalan, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro çoğaltılmaları. *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 23 (1998) Ek Sayı 2, 269-274. TÜBİTAK.
- Campell, R. N., 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. Pages 153-165 in Viruses with Fungal Vectors.J.I. Cooper and M.J.C Ashereds. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- Can, E., Çeliktaş, N., Hatipoğlu, R., 2000. Adi yalancıdarı (*Paspalum dilatatum* Poir.) bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna genotip ve

- 2,4-D konsantrasyonunun etkileri üzerine bir araştırma. *Turk J. of Agriculture and Forestry* 24:113-119. TUBİTAK.
- Cheah, L. H., Kent, G., Gowers, S., 2001. *Brassica* crops and streptomyces Sp. As potential biocontrol for clubroot of brassicas. *New Zealand Plant Protection* 54: 80-83.
- Chiang, M. S. and Crete, R., 1976. Diallel analysis of the inheritance of resistance to race 6 of *Plasmodiophora brassicae* in cabbage, *Can. J. Plant Sci.* 56, 865, 1976.
- Ciamporova, M., Pretova, A., 1981. Ultrastructural changes of plastids in flax embriyos cultivated *in vitro*. *New Pyhtol*, (87): 473-479.
- Diederichsen, E., Wagenblatt, B., Schallehn, V., Deppe, U., Sacristan, M.,1996. Transfer of clubroot resistance from resynthesised *Brassica napus* Into *Oilseed rape*-identification of race specific interactions with *P. Brassicae*. ISHS Acta Horticulturae 407:ISHS. Brassica Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop.
- Demir, A., 2005. Anter kültürü tekniği ile dihaploid keten çeşitlerinin geliştirilmesinde ebeveyn ve döllerin anter resposnlarının belirlenmesi. Omü Fen Bilimleri Enstitüsü. Yayınlanmamış Y. Lisans Tezi.
- Dengiz, O., Ic, S., and Sarioğlu, F.E., 2011. Physico- chemical and morphological properties of soils for *castanea sativa* in the central black sea region. *International journal of Agricultural Research. Academic Journals Inc.* ISSN 1816-4897 / DOI: 10.3923/ijar. 6(5): 410-419.
- Dixon, G.R., 2006. The Biology of *Plasmodiophora Brassicae* Wor. A review of recent advences. ISHS acta horticulturae 706: *IV Intilernational Symposium on Brassicas and XIV Crucifer Genetics Works hop.* Daejean, Korea.
- Fox, R.T.V. 1993. Isolation of fungi from specific substrates. Isolation from soil. Isolation of pathogens and their preminarily identifeication. Principles of Diagnostic Technigues İn Plant Pathology. Pages: *International Mycological İnstitute Bakeham Lane Egham Surrey TW209 TY UK.* Pages-41.
- Friedt, W., 1990. Biotechnology in breeding of industrial oil crops: The present status and future prospects. *Fat. Sci. Technol.* 90: 51-55.
- Gerrick, J. S. and Duffus, J. E., 1988. Differences in vectoring ability and aggressiveness of isolates of *polymxa betae*. *Phytopathology*, 78: 1340-1343.
- Gill, M. S. and Y. P. S. Bajaj, 1987. Hybridization between diploid (*Gossypium arboreum*) and tetraploid (*Gossypium hirsutum*) cotton through ovule culture. *Euphytica* 36(2): 625-630.
- Goralski, G., Przywar, L., Liu, C. M., 1998. İn-vitro culture of early globular-stage embriyos of *Brassica napus* L. *Acta bilogica cracoviensia, Series. Botanica*, 40:53-60.

- Gosal, S. S., Bajaj, Y. P. S., 1983. Interspecific hybridization between *Vigna mungo* and *Vigna radiata* through embryo culture. Biomedical and Life Sciences. *Euphytica*. Vol.32 (1):129-137.
- Grandclement, C., Laurens, F., Thomas, G., 1996. Genetic analysis of resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicaWoron) in two brassica oleracea groups (ssp. Acephala and botrysis) through diallel analysis. *Plant Breeding*. 115(3), 152-156.
- Hatipoğlu, R., 2001. Bitki biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi genel yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58.
- Hornby, D and Ullstrup, P, 1967. Fungal populations associated with maize roots. Composition and comparison of mycofloras from genotypes differing in root resistance. *Phytopathology* 57:869-875.
- Hanzel, J.J., Miller, P., Brinkman, M.A. and Fendos E. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop science.*, 25; 27-31.
- Karaca, Ö., Bürün, B., 1999. Buğdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 23, Ek Sayı 2: 269-274. TÜBİTAK.
- Kobelt, P., Fuchs, H., Sacristan, M. D., 2005. Microscopical examination of the defense reaction of three resistant *A. thaliana* L. Heynh. Ecootypes against *Plasmodiophora Brassicae* Wor.. Institut für angewandte genetik, Freie Universität Berlin, Albrecht-Thaer-weg 6,14195 Berlin. Germany. [Http://Reswww.Urz.Tu_Dresten.De/-Jsiemens/Plasmodiophora/Tubulin_1.Html](http://Reswww.Urz.Tu_Dresten.De/-Jsiemens/Plasmodiophora/Tubulin_1.Html).
- Kurt, O., 1995. Genetic and agronomic assesment of cultivars of linseed. (*Linum usitatissimum* L.). University of wales. (Yayınlanmamış Doktora Tezi).
- Kurt, O., 2004b. Bitki Islahı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı, 2. Baskı. Yayın No: 43.
- Kurt, O., Seyis, F., Uysal, H., Aydın, E., Demir, A., Özgür, Ü., 2009. Yemelik yağ kalitesi yüksek keten (*L. Usitatissimum* L.) çeşitlerinin geliştirilmesinde embriyo kültür tekniğinin kullanım olanakları üzerinde bir araştırma. Türkiye VIII.. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim, Hatay.
- Kurt, O., Uysal, H., Demir, A. ve R. Kılınç., 2010. Yemelik yağ kalitesi yüksek keten (*Linum usitatissimum* l.) çeşitlerinin geliştirilmesinde embriyo kültür tekniğinin kullanılması., 20. *Biyoloji Kongresi*, 21-25 Haziran, 2010. Denizli
- Kurt, O., Uysal, H., Demir, A., Kılınç, R. 2011. Erusik asit oranı düşük erkek kısır melez kolza gen havuzunun oluşturulması olanakları üzerinde bir araştırma. Endüstri bitkileri ve biyoteknoloji Cilt II. IX. *Türkiye Tarla Bitkileri Kongresi*. Sayfa 849-850. 12-15 Eylül 2011, Bursa.
- Kurt, O., 2011. *Bitki Islahı*. OMU, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders kitabı No: 43 (4. Basım).

- Le Boldus, J.M., Manolii, V. P., Turkington, T. K. and Strelkov, S. E., 2012. Adaptation to *Brassica* host genotypes by a single-spore isolate and population of *Plasmodiophora brassicae* (culbroot). *Plant Dis.* 96: 833-838.
- Mallikarjuna, N., 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from intraspecific incompatible pollinations in chickpea. Cellular and molecular biology division. International crops research institute for semi-arid tropics, Asia Center, Patancheru, P.O. Box 502 324, Andhra Pradesh, India. *Euphyta* 110: 1-6.
- Manzanares, M. J., Baron, F., Thomas, G., 1996. Host-pathogen interactions between *Brassica oleracea* genotypes and single spore derived isolates of *P. brassicae*. ISHS Acta Horticulturae 407: ISHS *Brassica* Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop.
- Mazin V.V., Protsenko, E.P., 1976. The pathogen of club root of crucifers *Plasmodiophora brassicae* Woron. Interactive agriculture ecological atlas of russian and neighboring countries. Moscow: *Nauka*. 192 p.
- Meijer, E.G.M. ve Brown, D.C.W., 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 10:11-19.
- Monnier, M. 1978. Culture of zygotic embryos. In: T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture*. University of calgary press, Canada, pp.277.
- Moraes-Fernandes, I. B., Zanatta, A. C. A., Prestes, A. M., Ceatano, V., Barcellos, A.L., Angra, D.C., Pandolfi, V., 2000. Cytogenetics and immature embryo culture at embrapa trigo breeding program: Transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Genet. Mol. Biol.* Vol. 23 No. 4. (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid).
- Morinaga, T., 1934. Interspecific hybridization in *Brassica*. VI. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia* (Tokyo) 6:62-67.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plantarum* 15:473-497.
- Parrot, W. A. and Bailey, M. A., 1993. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32: 69-76.
- Porth, G., Mangan, F., Wick, R., Autio, W., 2003. Evaluation of management strategies for clubroot disease of *brassicae* crops. *Vegetable notes*. March 2003. Volume 13, No:25 University of Massachusetts, Amherst MA (http://www.umassvegetable.org/newsletters/archive/2003/2003_03.pdf)
- Pretova, A., 1974. The influence of osmotic potential of the cultivation medium on the development of excised flax embryos. *Biol. plantarum* 16: 14-20.
- Pretova, A., 1986. Growth of zygotic flax embryos in vitro and influence of kinetin. *Plant cell reports*, 3:210-211.

- Pretova, A., Obert, B., 2003. Flax (*Linum usitatissimum* L.). A plant system for study of embriyogenesis. *Acta biologica cracoviensia series botanica*, 45/1: 15-18.
- Pretova, A., Williams, E., G., 1986. Direct somatic embriyogenesis from Immature zygotic embriyos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *journal plant physiol.* Vol. 126. pp. 155-161.
- Rennie, D.C., Manolii, V.P., Plishka, M., Strelkov, S.E., 2012. Histological analysis of spindle and spheroid root gaals caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Eur J plant pathol.* DOI 10.1007/s 10658-012-0119-X.
- Sakata, T., Tagawa, A., 2009. Characteristics of water absorpion and volume chance in primed cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) seeds. *American society of agricultural and biological engineers ISSN 0001-2351.* Vol. 52(4):1231-1238.
- Scholze, P and Hammer, K., 1998. Evaluation of resistance to *P. Brassicae*, alternaria and phoma in *Brassicae*. *Proc. Int.Symp. On Brassicae.* Eds. Thomas Gregoire & Antonio A. Monteiro. *Acta Hort.*459, ISHS, 1998.
- Sirkka, A. and Immonen, T., 2004. Comparison of callus culture with embryo culture at different times of embryo rescue for primary triticales production. *Biomedical and Life Sciences.* Vol. 70, No:3, p. 185-190. <http://www.Springerlink.com/content/k402783527664054/>.
- Song, K, Lu, P., Tang, K., ve T.C. Osborn., 1993. Development of synthetic *Brassica* amphidiploids by reciprocal hybridization and comparison to natural amhidiploids, *Theor. Appl. Genet.* 86:811-821.
- Sönmez, F., 2005. Kültür bitkilerinde zarar yapan hastalık ve zararlıların tanınması ve mücadelesi. T.C. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü Bitki Koruma Şube Müdürlüğü Bildirisi.
- Suwabe, K., Tsukazai, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Fujimura, M., Nunome, T., Fukuoka, H., Matsumoto, S., Hirai, M., 2000. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in L. National institute of vegetable and tea science (NIVTS), 360 Kusawa, Ano, Age, Mie 514-2392, JapanYork. Toronto. London.
- Tangolar, S., Gök, S., Ergenoğlu, F. ve Çetiner, S., 1998. Bazı çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin embriyo kültüründen yararlanılarak çoğaltılması. *Turkish J. of Agriculture and Forestry*, 22:87-92. TUBİTAK.
- TUİK. Bitkisel Üretim İstatistikleri (<http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) 2013.
- TUİK. Bitkisel Üretim İstatistikleri (<http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) 2014.
- Tremby, N., ve diğ. (1999). Crucifers bir Clubroot: Kontrol Stratejileri. "Tarım ve Agrifood Kanada." Alınan <http://publications.gc.ca/collections/Collection/A42-85-1999E.pdf> Mart 2012.

- U, N., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization, *Jap. J. Bo.*, 7 :389-452.
- Uysal, H., Seyis, F ve Kurt, 2006. Tarla bitkilerinde melezleme bariyerlerinin aşılmasında alternatif bir yöntem: Embriyo kültürü.
- Walker, J. C., 1952. *Diseases of vegetable crops*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York. Toronto. London.
- Walker, K.A. and Sato, S.J., 1981. Morphogenesis in callus tissue of *medicago sativa*: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1:109-121.
- Wallenhammar, A. C., Johnsson, L., Gerhardson, B., 1994. Clubroot resistance and yield loss in spring oilseed turnip rape and spring oilseed rape. Plant Pathology and Biological Control Unit. P. O. Box 7035, SE 7 Uppsala, Sweden. ([http:// www.regional.org.au/ au/ gcirc/ 3/438.htm](http://www.regional.org.au/au/gcirc/3/438.htm)).
- Wakeham A. J. and White J.G. 1996. Serological detection in soil of *Plasmodiophora brassicae* resting spores. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. volume 48, Issue 5, May 1996, Pages 289-303. DOI: 10.1006/pmpp.1996.0024.
- Williams, P. H., 1966. A system for The determination of races of *P. brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology*, 56: 624-626.
- Yoshikawa, H., 1983. Breeding for clubroot resistance of crucifer crops in japan. *japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)* Vol.17, No.1, p.6-11.
- Young, Q. S., Zhang, X., Shi, J., Yan, Q. S. Zhang, X. Q. and Liu, J.M., 1981. Green plant regeneration from protoplasts of barley (*H. vulgare* L.) *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, (2):89-93.
- Xue, S., Cao, T., Howard, R.J., Hwang, S. F and Sterelkov, S.E. 2008. Isolation and variation in virulence of single-spore isolates of *plasmodiophora brassicae* from canada. *Plant Dis*. 92: 456-462.
- Zhang, G., Q., Zhou, W., J., Gu, H., H., Song, W., J. and Momoh, E., J., (2003). Plant regeneration from the hybridization of *brassica juncea* and *brassica napus* through embryo culture. *J. Agronomy and Crop Science*, 189:347:350.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Ayten DEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : 1977, ORDU/Mesudiye
Adres : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Atakum/SAMSUN
E-Posta : aytendemir1919@hotmail.com
Lisans : OMÜ, Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü (1996-2000)
Yüksek Lisans : OMÜ, Fen Bilimleri Enst. (2002-2005)

Yayın Listesi :

- 1) Kurt, O., Yılmaz, S., **Demir, A.**, 2005. Keten'in Verim ve Verim Unsurları ile Ham Yağ Oranına Bitki Büyüme Düzenleyicisi Uygulama Zamanı ve Azotlu Gübre Dozu Uygulamasının Etkileri. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20(3):16-22
- 2) Kurt, O., Ilgın, M., **Demir, A.**, 2005. Ketende Çimlenmeye Ön Muamele Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya (Araştırma Sunusu Cilt I, Sayfa 223-228).
- 3) Kurt, O., Doğan, H., **Demir, A.**, 2006. Samsun Ekolojik Koşullarına Uygun Kışlık Keten Çeşitlerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006, 21(1):1-5.
- 4) **Demir, A.**, Seyis, F., Kurt, O., 2006. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar:1. Bitkiler OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006, 21(2): 249-260.
- 5) Kurt, O., Seyis, F., Uysal, H., Aydın, E., **Demir, A.**, Özgür, Ü. G., 2009. Yemeklik Yağ Kalitesi Yüksek Keten (*L. usitatissimum* L.) Çeşitlerinin Geliştirilmesinde Embriyo Kültür Tekniğinin Kullanım Olanakları Üzerinde Bir Araştırma, Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, Hatay. Sunulu Bildiriler Kitabı Cilt 1. Sayfa. 742-746.
- 6) Kurt, O., Uysal, H., **Demir, A.**, Kılınç, R., 2010. Embriyo Kültürü ile Yemeklik Yağ Kalitesi Yüksek Keten (*L. usitatissimum* L.) Çeşitlerinin Geliştirilmesi Üzerinde Bir Araştırma. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye. Bildiriler Kitabı. Sayfa, 365-366.

- 7) Kurt, O., Uysal, H., **Demir, A.**, Özgür, Ü. G., Kılınç, R., 2011. Samsun Ekolojik Koşullarına Adapte Olabilecek Kışlık Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Genotiplerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi. 2011, 26(3): 212-216.
- 8) Kurt, O., Uysal, H., **Demir, A.**, Kılınç, R., 2011. Erusik Asit Oranı Düşük Erkek Kısır Melez Kolza Gen Havuzunun Oluşturulması Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. IX. Türkiye Tarla Bitkileri Kongresi 12-15 Eylül 2011. Bursa Endüstri Bitkileri ve Biyoteknoloji Çağrılı Bildiriler Kitabı Cilt II. Sayfa, 846-851.
- 9) Sezer, İ., Kurt, O., Öner, F., Uysal, H., Akay, H., **Demir, A.**, 2011. Samsun İlinde, Tarım ve Çevre Açısından Uygulanabilecek Tarla Tarım Üretim Sistemlerinin İrdelenmesi. Samsun Sempozyumu, 13-16 Ekim 2011. Samsuna Bir Parentez Açıyoruz Sunulu Bildiri Kitabı, Cilt III, Sayfa.325-332.
- 10) Kurt, O., Uysal, H., **Demir, A.**, 2012. Yemeklik Yağ Kalitesi Yüksek Keten (*L.usitatissimum* L.) Çeşitlerinin Islahı Üzerinde Bir Araştırma. TABAD Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 5(1): 68-72, 2012 ISSN: 1308-3945, E-ISSN:1308-027X, www.nobel.gen.tr
- 11) **Demir, A.**, Kurt, O., 2012. Tarımsal Üretimde Yeni Bir Yaklaşım: Transgenik ve Organik Tarım. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5(2):102-105, 2012.
- 12) Kurt, O., Uysal, H., **Demir, A.**, Göre, M. 2015. Samsun Ekolojik Koşullarında Geliştirilen Bazı Keten (*Linum usitatissimum* L.) Hatlarının Tarımsal Özelliklerinin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi. (30): 136-140.
- 13) Kurt, O., **Demir, A.**, Göre, M., Uysal, H. 2013. Samsun Ekolojik Koşullarında Bazı Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarının Tarımsal Özelliklerinin Belirlenmesi 10. Türkiye Tarla Bitkileri Kongresi 10-13 Eylül Konya.