

ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİMDALI



PRUNUS ARABİCA (OLİVIER) MEİKLE NİN İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAKBULE GÖK

ŞIRNAK - 2019

ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

***PRUNUS ARABİCA (OLİVIER) MEİKLE*'NİN İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM**
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MAKBULE GÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞIRNAK - 2019

ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİMDALI

PRUNUS ARABICA (OLİVİER) MEİKLE’NİN IN VİTRO MİKROÇOĞALTIM
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MAKBULE GÖK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu Tez 12 /06 /2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Yüksek Lisans Tezi Olarak Kabul Edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özgür KARAKAŞ

İmza:

(Şırnak Üniversitesi Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi M.Settar ÜNAL

İmza:

(Şırnak Üniversitesi Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sabahattin CÖMERTPAY

İmza:

(Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji)

Bu tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalında hazırlanmıştır.

Yöksis Tez Kodu:

İmza

Doç. Dr. Derya YÜCEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm. Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eseri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Makbule GÖK

ÖZET

PRUNUS ARABICA (OLIVIER) MEİKLE'NİN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MAKBULE GÖK

ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman :Dr. Öğr. Üyesi Özgür KARAKAŞ

Yıl :2019

Sayfa 43

Jüri :Dr. Öğr.Üyesi Özgür KARAKAŞ

:Dr.Öğr.Üyesi M.Settar ÜNAL

:Dr.Öğr.Üyesi Sabahattin CÖMERTPAY

Prunus arabica (Olivier) Meikle İran, Irak, Filistin, Ürdün, İsrail ile Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinde; Kilis, Gaziantep, Adıyaman, Mardin, Şırnak ve Siirt illerinde yetişen çalı formunda bir yabancı badem türüdür. Özellikle Ürdün'ün güneydoğusunda kurak iklim şartlarında sert çekirdekli meyve türlerinde verim ve kaliteyi arttırmak için anaç olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda anaçlık potansiyeli yüksek olan *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin *in vitro* klonal mikroçoğaltımı araştırılmıştır. Çalışmada eksplant olarak kullanılan çelikler bahar döneminde yapraklar açılmadan önce olgun bitkilerden alınmıştır.Yüzeysel sterilizasyondan sonra en iyi çoğaltma ortamını ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla eksplantlar 0,01 IBA ve 1 mg/L BA içeren MS, NRM, DKW ve WPM besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Köklendirme üzerine IBA'nın farklı konsantrasyonları (0.25,0.5,0.75, 1,0 mg/l) ile aktif kömürün etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada sürgün başına ortalama sürgün sayısı sırası ile NRM (11,5adet/eksplant), WPM (9,6 adet/eksplant), DKW (3,29 adet/eksplant) ve MS (1,5 adet/eksplant) ile en iyi NRM ortamı üzerinde olmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından kullanılan kültür ortamları arasında sırası ile NRM (3,4cm), DKW (3,2cm), WPM (2,1cm) ve MS (1,3cm) ile tekrar en iyi sonuç NRM ortamından elde edilmiştir. Köklenme açısından bakıldığında aktif kömürün köklenme üzerine çok fazla etki etmediği gözlenmiş ve en iyi köklenme oranı %18 ile 0,5mg/L IBA içeren aktif kömürlü ortamdakaydedilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Prunus arabica*, *in vitro*, köklenme, IBA, NRM

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IN VITRO MICROPROPAGATION PROPERTIES OF *PRUNUS ARABICA (OLIVIER) MEIKLE*

MAKBULE GÖK

SIRNAK UNIVERSITY

INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Msc.THESIS

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Özgür KARAKAŞ
Year :2019
Page 43
Jury : Asst. Prof. Dr. Özgür KARAKAŞ
:Asst. Prof. Dr. M.Settar ÜNAL
:Asst. Prof. Dr. Sabahattin CÖMERTPAY

Prunus arabica (Olivier) Meikle grows in the form of a wild almond species in Iran, Iraq, Palestine, Jordan, Israel and Turkey's Southeastern Anatolia region; Gaziantep, Adiyaman, Mardin, Sirnak and Siirt. Especially in the southeast of Jordan, it is used as rootstock to increase the yield and quality of hard-core fruit species in arid climatic conditions.

The objective of the current study was to develop a micropropagation protocol for *Prunus arabica* (Olivier) Meikle, which has a high potential rootstock ability for stone fruits. Dormant cuttings from mature plants before the leaves were opened in spring shoots were used as the explant source. To determine optimum micropropagation rate and the culture medium suitable for stabilization and sustainability of cultures, the explants were cultured on NRM, MS, WPM and DKW medium containing 0.01mgL⁻¹IBA and 1 mgL⁻¹BA. To determine the best rooting the explants were cultured on NRM containing 0.25,0.5,0.75, 1.0 mg/L⁻¹ IBA.

In this study, the average number of shoots per shoot were obtained on NRM (11.5), WPM (9.6), DKW (3.29) and MS (1.5) respectively. The average shoot length were obtained on NRM medium.(4cm), DKW (3.2cm), WPM (2.1cm) and MS (1.3cm) respectively. In terms of rooting, it was observed that activated charcoal did not have much effect on rooting and the best rooting rate was recorded in 18% to 0.5 mg / L IBA containing activated charcoal medium. The rooting rate of microshoots propagated from mature plants was insufficient (less than 18%) for practical use.

Key words: *Prunus arabica*, in vitro, Rooting, IBA, NRM

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında olduğu gibi, yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesi aşamasında da yakın ilgisi, yönlendirici katkısı ve değerli yardımları için danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özgür KARAKAŞ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Zeynep NAS ve Gamze GÜNDOĞDU'ya teşekkürlerimi sunarım. Tüm eğitimim boyunca bana her konuda destek veren ve cesaretlendiren aileme gönöl dolusu teşekkürlerimi, minnettarlığımı ifade etmek isterim.



ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Metot.....	13
3.2.1. Aşama I: Bitki Materyalinin (eksplant) Yüzeysel Sterilizasyonu.....	13
3.2.2. Besin Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu.....	16
3.2.3. Kültür Şartları.....	16
3.2.4. Sürgün Ucu ve Lateral Eksplantlarının Başlangıç Ortamında Kültüre Alınması.....	17
3.2.5. <i>In Vitro</i> Sürgün Çoğaltımı ve Çevre Koşulları.....	17
3.2.6. Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu için uygun ortamın belirlenmesi.....	19
3.2.7. Sürgün Gelişimi.....	20
3.2.7.1. Sürgün Gelişimi Üzerine uygun BA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	21
3.2.7.2. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun TDZ Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	21
3.2.7.3. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun Meta-Topolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	22
3.2.7.4. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun 2-İP Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	23
3.2.8. Köklendirme.....	24
3.2.8.1. Aktif Kömürün Köklenme Üzerine Etkisi.....	25
3.2.8.2. Pişkinleştirme ve Dış Koşullara Alıştırılması.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Genel Gözlemler.....	27
4.2. Farklı Kültür Ortamlarının(NRM, WPM,MS,DKW) Stabilizasyonu ve <i>Prunus arabica</i> 'nın Gelişimi Üzerine Etkisi.....	27

4.3. Mikrosürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Ortama Aktarılması.....	35
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	43



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1. 1. Kıtalara göre 2010-2016 yılları arası dünya badem üretim alanları(ha).....4	
Çizelge 1. 2. Badem üretiminde lider ülkelere ait badem üretimi değerleri (ton) 4	
Çizelge 1. 3.Yıllara göre Türkiye badem ağaç sayıları (adet) ve üretim (ton) verileri.....5	
Çizelge 3.1.Nas ve Read(NRM) (2004), Murashige ve Skoog(MS) (1962), Driver ve Kuniyuki (DKW) (1984), Woody Plant Medium(WPM) Ortamlarının Kimyasal Bileşimi..... 14	
Çizelge 4. 1.Farklı kültür ortamlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi...28	
Çizelge 4. 2.Ortam ve Tekerrürün sürgün uzunluğu üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi...29	
Çizelge 4. 3. Farklı Hormon konsantrasyonlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi..... 30	
Çizelge 4. 4. Farklı Hormon konsantrasyonlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi..... 31	

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin arazideki görünümü...	12
Şekil 3.2. Eksplantlar kültüre alındıktan sonra kapakların alt kısımları streç film ile sarılan tüpler.....	13
Şekil 3.3. Laboratuvar ortam hazırlama çalışmaları.....	15
Şekil 3.4. Steril kabin içerisinde mikrosürgünlerin bir alt kültüre alınması....	16
Şekil 3.5. Kültüre alınmış ve süren Eksplantlar.....	16
Şekil 3.6. Alt kültüre alınmış eksplantlar.....	18
Şekil 3.7. Alt kültüre alındıktan sonra bulaşma görülen eksplantlar.....	18
Şekil 3.8. Mikrobiyal bulaşmadan arî ve sağlıklı görünen eksplantlar....	19
Şekil 3.9. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin farklı kültür ortamlarındaki görünümü.....	20
Şekil 3.10. Prunus arabica (Olivier) Meikle'nin farklı BA konsantrasyonlarındaki gelişimi....	21
Şekil 3.11. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin farklı TDZ konsantrasyonlarındaki gelişimi....	22
Şekil 3.12. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin farklı Meta-Topolin konsantrasyonlarındaki gelişim.....	23
Şekil 3.13. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin farklı 2-İP konsantrasyonlarındaki gelişimi....	24
Şekil 3.14. Prunus arabica (Olivier) Meikle 'nin dört farklı IBA konsantrasyonlarına aktarımı.....	25
Şekil 4.1. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama Sürgün sayısı.....	28
Şekil 4.2. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün uzunluğu....	29
Şekil 4.3. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün sayısı.....	30
Şekil 4.4. Farklı hormon bileşimine bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları....	31
Şekil 4.5. Farklı NRM ortamında farklı 2İP konsantrasyonu varlığında eksplant başına	

meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve Sürgün Uzunluğu... ..	32
Şekil 4.6. NRM ortamında farklı MT konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve Sürgün Uzunluğu... ..	33
Şekil 4.7. NRM ortamında farklı TDZ konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve Sürgün Uzunluğu... ..	34
Şekil 4.8. NRM ortamında farklı BA konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve Sürgün Uzunluğu... ..	35
Şekil 4.9. Köklendirme muamelesinden yaklaşık 30 gün sonra mikrosürgünlerde meydana gelen kökler ve akklimatize edildikten sonra dış ortama aktarılan mikrosürgünler... ..	36



SİMGELER VE KISALTMALAR

NRM	:Nas ve Read besin Ortamı
MS	: Murashige ve Skoog besin ortamı
DKW	:Driver ve Kuniyuki besin Ortamı
WPM	: Woody Plant besin Ortamı
BA	:Benzyladenine
IBA	:İndol bütirik Asit (Indole-3-butyric Acid)
HCl	:Hidroklorik asit
NaOH	: Sodyumhidroksit
TDZ	: Thidiazuron
mT	: Meta- Topolin
2-İP	: 6-(γ,γ - Dimethyl allyl amino)-purine
μ M	: mikromolar
mg	: miligram
dk	:dakika
cm	:santimetre
TÜİK	:Türkiye İstatistikler Kurumu
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations

1.GİRİŞ

1.1.Genel Bilgiler

Badem, *Rosaceae* familyasının *Prunus* cinsine bağlı *Prunus amygdalus* alt tür içerisinde yer almaktadır. *Prunus amygdalus* alt cinsi içerisinde 40'a yakın badem türü bulunmaktadır (Denisov, 1988; Kester ve Gradziel, 1996; Soylu, 2003). *Prunus amygdalus* Batsch. (sinonim *Prunus dulcis* Miller) daha çok meyvesi için önem kazanmış ve Tianşan Dağları'ndan Kafkasya'ya kadar, Afganistan ve İran boyunca yayılmıştır. Bu bölgelerde çeşitli yabani formları bulunmaktadır. Bunlardan üstün nitelikli ve içi tatlı olanların kültüre alınmasıyla bugünkü kültür bademi meydana gelmiştir (Kester and Asay, 1975). Antik çağlardan günümüze kadar buralardan Akdeniz ülkelerine yayılım göstermiştir (Rugini ve Monastra, 2003). En eski meyve türlerinden birisi olan bademin yetiştiriciliği dört bin yıl önce İran, Türkiye, Suriye ve Filistin' de başlamış ve buralardan Yunanistan, Kuzey Afrika ve İtalya'ya, yayılmış, daha sonra ilk kolonistler tarafından da Kuzey Amerika'ya götürülmüştür (Kester ve Asay, 1975). Günümüzde badem yetiştiriciliği kuzey yarımkürede 30-44 enlem derecelerinde, güney yarımkürede 20-40 enlem derecelerinde 600-1000 m yüksekliklerde ekonomik olarak yetiştirilmektedir (Özbek, 1978).

Badem ağaçları çeşitlere göre değişmekle beraber genel olarak 6-12 m'ye kadar uzamakta, yıllık dallar üstünde oluşan tomurcuklar bir sonraki yıl gelişim göstermektedir. Yeni geliştirilen badem çeşitleri (Ferragnes, Ferraduel vb.) bakım koşullarına bağlı olarak 3 yaşından itibaren yeterli olmadığından yer değiştirme esnasında büyük miktarda fidan kayıpları meydana ekonomik olarak meyveye yatmaktadır. Bitki kazık kök yapısına sahip olup saçak kök yapısı gelmektedir. Badem yaprakları genellikle kenarları dişli, iri, orta ve küçüktür. Çiçekler 5 çanak, 5 taç, 20 erkek organ ve 1 dişli organdan meydana gelmektedir. Çiçek tomurcuğu saf tomurcuktur. Çiçek yapısı iki eşeylidir (hermafrodit) ve karpelde iki tohum taslağı yer almaktadır. Tam çiçek yapısına sahiptir. Taç yapraklar pembe veya beyaz renkte olup yumurtalık içerisinde iki tane tohum taslağı bulunmaktadır.Genel olarak bunlardan sadece bir tanesi gelişim gösterir.Ama, iki tohum taslağının gelişim gösterdiği durumda çift meyve oluşumu görülür ve bu meyvelerin ticari değeri yoktur (Küden ve ark., 2014).

Bademde tozlaşma, birkaç çeşit dışında arılarla olmaktadır. Badem çeşitleri kendine uyumsuzdur. Bu nedenle badem bahçeleri en az iki çeşit üzerine kurulmalıdır. Genellikle Akdeniz iklimi meyve türü olan badem yazları uzun süren sıcak ve kışları sıcaklığın -25°C 'nin altına düşmeyen bölgelerde ekonomik olarak yetiştirilebilmektedir. Kışları -18°C 'de gözler zarar görür. 7.2°C altında 300-500 saat soğuklama ihtiyacı duyar. Birçok ılıman meyve türünden daha önce çiçek açan badem bitkisi kış soğuklarından ziyade ilkbahar geç donlarından etkilenmektedir. Pembe tomurcuk döneminde -4°C ile -6.5°C , çiçeklenme başlangıcında -3°C ile -4°C , çiçeklenme sonuna doğru -1.5 ile -2.0°C ve çağa döneminde ise -1 ile -0.5°C 'de zarar gördüğü bilinmektedir. Badem meyvesinin özellikle çağa döneminde ilkbahar donları bakımından riskli olan bölgelerde geç çiçeklenen çeşitlerin geliştirilmesi badem ıslah programının önemli bir hedefi olmuş (Alkan ve Seferoğlu, 2014a) ve bu hedef başarılı teknikler ile yeni çeşitlerin geliştirilmesiyle birlikte amacına ulaşmış durumdadır. Birçok bitki tür ve çeşidinde olduğu gibi bademde de çiçeklenme zamanları farklılıklar gösterebilmektedir. Çeşitler erken, orta ve geç çiçeklenenler olarak gruplandırılmaktadır. Badem bitkisi çiçeklenme süresi uzun olan türlerden biri olup çiçeklenme tarihleri yıllara göre değişebilmektedir. Geç çiçeklenen çeşitlerin elde edilmesiyle uygun yüksek sıcaklıklarda daha yüksek tozlanma ve dölleme imkanı sağlanacaktır. Ülkemizde ilkbahar donları dikkate alınarak özellikle geç çiçeklenen ve son zamanlarda dünyada oldukça yaygınlaşan çeşitleri (Ferragnes, Ferraduel, Cristomorto, vb.) seçilmektedir (Alkan ve Seferoğlu, 2014b).

Pomolojik olarak badem acı ve tatlı olmak üzere iki gruba ayrılır. Acı bademler siyanidik asit içermektedir. Bu yüzden yenilmesi sakıncalı olup çoğu yağı için yetiştirilmektedir. Kırılma durumlarına göre tatlı bademler dört farklı gruba ayrılır. Bunlar; el bademi, diş bademi, sert kabuklu bademler ve taş badem olarak sınıflandırılmıştır. El bademleri kabukları çok ince olup randımanı %70 civarındadır. Diş ile kolaylıkla kırılan diş bademleri %50 randımanlıdır. Diş ile kırılması oldukça güç olan sert bademlerin randımanı %40 civarında olup taş bademler ise %18-30 randıman içerir (Küden ve ark., 2014).

Ticari olarak iyi bir badem çeşidinde bulunması gereken özellikler; ağaç gelişiminin kuvvetli olması, bol miktarda çiçek açması, çiçeklenmenin geç olması, diğer ticari çeşitlerle döllenebilmesi, bol ve standart ürün vermesi, meyvelerin aynı zamanda olgunlaşması ve rüzgarda dökülmemesi, yeşil kabuğun kolay kavlaması, çift iç oranının

düşük olması, randımanın ve iç kalitesinin yüksek olması, çevresel şartlar, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı olmasıdır (Anonim, 2012).

Badem tüketimi çok yönlü olan bir meyve türüdür. Badem çağla olarak taze iç badem, kavrulmuş (tuzlu-tuzsuz) badem olarak tüketilmekle beraber şekerleme, çikolata ve pasta sanayisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca badem unu, badem yağı, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadır. Badem içinin kullanımına ilaveten dış yeşil kabuğunun da hayvan beslenmesinde kullanıldığı, ineklerde süt verimini arttırdığı bildirilmektedir (Aradhya ve Stover, 2006; Parlakçı, 2008).

Bütün meyve türlerinde olduğu gibi modern yetiştiricilikte bademlerin vegetatif yollarla çoğaltılmaları gerekmektedir. Badem, köklenmesi zor olan bir tür olduğu için klonal çoğaltılması aşı yoluyla yapılmaktadır. Ancak aşıyla çoğaltılmada karşılaşılan çeşitli nedenlerden dolayı yetiştiricilerin fidan taleplerinin karşılanması yavaş olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı mikroçoğaltım gibi daha etkili alternatif çoğaltma metodlarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü mikroçoğaltım en hızlı klonal çoğaltma şeklidir (Bhojwani ve Razdan, 1996; Nas ve Read, 2004a; Suttle, 1996) ve piyasaya yeni sürülen çeşitlerin fidanlarının hızlı bir şekilde üreticilere dağıtılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır.

Doku kültürü ile çoğaltılan bitkiler çoğunlukla daha kolay köklendiklerinden aşuya gerek duyulmamakta ve aşı ile çoğaltmada görülen sorunlar ortadan kalkmaktadır (Nas ve Read, 2003).

Dünyada badem yetiştirilen toplam tarım alanı 1.732.099 ha olup en büyük üretim alanı 652.246 ha ile Avrupa kıtası iken ikinci büyük üretim alanına sahip kıta ise 454.204 ha ile Afrika görülmektedir. Bu iki kıta her ne kadar büyük üretim alanlarına sahip olsalar da, 352.077 ha ile Kuzey Amerika'da bu kıtalardan daha fazla kabuklu badem üretilmektedir (Çizelge 1.1). Dünya badem üretiminin yaklaşık olarak % 58'ini ABD tek başına gerçekleştirmektedir (Gül Yavuz, 2011).

Avustralya kıtası ile ülkemizde badem üretim alanları aynı olmasına rağmen, burada ülkemizden iki kat daha fazla üretim gerçekleşmektedir. Asya kıtasında badem üretiminde lider ülke İran olarak görülürken, Avrupa'da lider konumdaki iki ülke İspanya ve İtalya görülmektedir. Badem üretim miktarlarında bu iki ülkede yıllara göre dalgalanmalar görülmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1. 1. Kıtalara göre 2010-2016 yılları arası dünya badem üretim alanları (ha).

Kıtalar/Yıllar	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Afrika	419.823	447.115	456.644	460.319	455.291	446.957	454.204
Asya	270.709	263.737	297.125	344.782	259.776	299.927	349.722
Avrupa	680.250	658.474	644.320	636.631	625.485	652.875	652.246
Amerika	319.555	332.624	340.905	352.943	361.023	368.644	388.311
Avustralya	29.340	30.390	28.472	28.586	28.967	31.115	20.550
TOPLAM	1.719.677	1.732.340	1.767.466	1.823.261	1.730.542	1.799.518	1.865.033

Çizelge 1. 2. Badem üretiminde lider ülkelere ait badem üretimi değerleri (ton).

Ülke/ Yıl	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
ABD	1.413.800	1.841.587	1.655.000	1.732.800	1.545.500	1.787.033	2.002.742
İspanya	222.518	208.800	211.700	143.081	195.704	211.084	202.339
Avustralya	90.000	34.576	31.105	56.779	55.978	165.018	72.902
İran	121.427	119.322	120.464	155.527	136.338	146.000	147.863
Fas	87.104	96.231	99.067	93.310	101.026	97.723	112.681
İtalya	108.160	104.790	89.865	72.584	74.016	70.399	74.584
Türkiye	55.398	69.838	80.261	82.850	73.230	80.000	85.000
TOPLAM	2.098.407	2.475.144	2.287.462	2.336.931	2.181.792	2.557.257	2698111

Ülkemizdeki badem üretim alanı hemen hemen 27.020 ha olup bu alandan dünya badem üretiminin sadece % 3'ü karşılanmaktadır. Dünyada 2.698.111 ton badem üretimi olup Türkiye bu üretim içerisinde son verilere göre 85.000 ton kabuklu badem üretimine sahiptir.

Dünyada yedinci büyük üretici ülke durumunda olan Türkiye, badem üretiminde 2016 yılı verilerine göre 85.000 ton badem elde etmiştir. Ülkemizde toplam meyve üretiminin yaklaşık olarak % 6.4'ü sert kabuklu meyvelerden oluşmaktadır. Sert kabuklu meyve ağaç sayılarının % 1.2'sini ve üretim miktarının ise % 4.3'ünü badem oluşturmaktadır (Özsu, 2003). Yüksek don yaşanan yıllar haricinde 2010 yılından itibaren badem üretiminde yaklaşık olarak % 45 üretim artışı sağlanmıştır (Çizelge 1.3). Bölgelere göre sınıflandırma yapıldığında Ege bölgesi badem üretiminin yaklaşık % 30'unu karşılamaktadır. Ege bölgesini sırasıyla Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Batı Marmara bölgeleri izlemektedir. Badem alanlarının iller bazında dağılımında Muğla'yı sırasıyla Manisa, Balıkesir, Antalya ve Mersin illeri izlemektedir. Bu illerin sahip olduğu badem alanları, 60 bin dekar ile toplam badem alanlarının % 37'sini meydana getirmektedir.

Çizelge 1. 3.Yıllara göre Türkiye badem ağaç sayıları (adet) ve üretim (ton) verileri.

Yıllar	Meyve Veren (Adet)	Meyve Vermeyen (adet)	İthalat (ton)	İhracat (ton)	Üretim (ton)
2010	3.683	2.589	23.030	13.433	55.398
2011	4.221	3.101	34.626	19.537	69.838
2012	4.679	3.242	25.774	19.664	80.261
2013	5.256	3.602	30.413	22.670	82.850
2014	5.637	3.815	18.542	12.636	73.230
2015	5.864	4.295	20.921	12.696	80.000
2016	6.664	4.964	36.241	19.149	85.000
2017	6.810	5.099			90.000

Modern badem yetiştiriciliği, Amerika ve Avrupa ülkelerinde çok sayıda standart çeşitle yapılmakta ve ıslah amaçlarına yönelik çeşitler geliştirilmektedir. Türkiye açısından bakacak olursak; zengin badem gen kaynaklarına sahip olmamıza rağmen az sayıda geliştirilen çeşitle sınırlı miktarda üretim yapılmakta, hâlâ isimleri bilinmeyen çöğür ağaçlardan üretimimizin çok büyük bir kısmı sağlanmaktadır. O halde bir taraftan badem genetik kaynaklarımızın araştırılarak üstün niteliklere sahip olanların tanımlanması, diğer taraftan da seleksiyonlara ait klonlarının oluşturularak gerçek değerlerinin belirlenmesi ve üstün nitelikli olanların meyveciliğimize kazandırılması gerekmektedir (Balta 2002; Ağlar, 2005; Gülsoy, 2012).

Ülkemizde var olan badem potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmalar genellikle genetik materyalin belirlenmesi ve korunması, mevcut popülasyonlar içerisinde en iyi tiplerin seleksiyonu, melezleme ve yabancı çeşitlerin ülkemiz ekolojik koşullarına adaptasyonu konularında yapılmıştır. Yerli tiplerle kıyaslandığında yabancı çeşitler genellikle daha üstün özellikler taşıdığı için çalışmalar bu çeşitlerin ülkemiz ekolojisine adaptasyonları ve çoğaltılmaları üzerine yoğunlaşmıştır .

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bahçe bitkilerinde birçok bitki türü, hücre ve doku kültürü teknikleri kullanılarak köklendirilebilir ve çoğaltılabilir. Fakat doku kültürü teknikleri yüksek maliyetlidir ve yoğun çaba gerektirir. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında bitkilerin mikroçoğaltımında kullanılan cam yada plastik malzemenin cinsi(bitkinin alması gereken ışık miktarına bağlı olarak), bitkinin kalitesini, büyümesini, yaşama süresini ve çoğaltımını etkilemektedir.

Tuano, Ferragnes Fascinello badem çeşitleri üzerine yapılan bir çalışmada ; Seleksiyon yolu ile elde edilmiş M49, M50, M51, M52, M53 ve M55 bademler ; Gala ve Prunus pyraaster klonlarının üç tipi (P8, P38 ve P50); McIntosh elma çeşitleri; Ontario erik çeşidi; Denemeye alınmıştır. Deneme her seleksiyon veya çeşit başına 3 tekerrür, her tekerrürde 8-10 sürgün olacak şekilde kurulmuştur. Ontario erik çeşidi SH besi ortamında, diğer türler ise MS ortamında daha iyi gelişim katsayısı göstermiştir. GF-677, 0.35 mg/L BAP, 0.1 mg/L GA3 ve 1.0 mg/L IBA ilave edilen MS temel besin ortamında %85 oranında köklenme göstermiştir (Damiano ve Monticelli, 1998).

Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis L.*) çeşitlerinin in vitro mikro çoğaltım özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada sürgün ucu kültürü ile in vitro çoğaltma olanakları incelenmiştir. Bu amaçla; farklı BAP ve IBA miktarları, üç farklı alt kültürde (ilk kültüre alma, şaşırtma ve çoğaltma) ayrı ayrı test edilmiştir. Sürgün gelişimi açısından hormonsuz ve sadece düşük miktarda IBA (0.1 mg/L) içeren ortamların daha uygun olduğunu görülmüştür. Hem şaşırtma hem de çoğaltma aşamasında sürgün verimi ve gelişmesi açısından en iyi sonucu 1.0 mg/L BAP ile 0.1 mg/L IBA interaksyonu vermiştir. Sürgün sayısı üzerine her iki aşamada da BAP'ın etkili olduğu gözlenmiştir, ancak yüksek konsantrasyonda BAP (2.0 veya 3.0 mg/L BAP) kullanımını sürgünlerde camlaşma, sürgünlerin canlılığında düşme ve kallus oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir (Gürel ve Gülşen, 1998a).

In vitro doku kültürü yöntemiyle GF-677 anacının çoğaltımının araştırıldığı bir çalışmada eksplantlar Nisan ayında taze sürgünlerden alınmıştır. Farklı hormon konsantrasyonlarının denendiği çalışmada sürgün çoğaltımı için en iyi sonucu 1 mg/L BA vermiştir. 0.3 mg/L NAA ve 1.6 mg/L thiamine içeren ortamda 7 günlük karanlık uygulamasından en yüksek köklenme elde edilmiştir (Kamali ve ark., 2001).

Sürgün ucu ile çoğaltımın denendiği bir çalışmada Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitlerinin sürgün uçları kullanılmıştır. Sürgün uçları, 4 °C’de 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda 1 ay boyunca kültüre alınmıştır. Mikro sürgünlerin köklenme yeteneğine en iyi uygun hormon konsantrasyonunu bulmak amacıyla IBA ve NAA’nın farklı konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Ayrıca köklenme üzerine düşük ışığın (gölge) ve tuz stresinin etkisi araştırılmıştır. Her iki çeşit için en iyi sonuç, 1,0 mM ile % 0.6’lık su-agar solüsyonu içinde 12 saat bekletildikten sonra sürgünlerin 15 gün oksinsiz ortama aktarılmasından alınmıştır. Bir alt kültüre alınan eksplantlar gün karanlıkta bırakıldıktan sonra 16/8 saat aydınlık karanlık koşullara aktarılmıştır. Karanlık sürecinin uzatılması köklenmeyi arttırmamıştır. ½ MS ortamında Ne Plus Ultra sürgünlerinin köklenmesine rağmen Nonpareil sürgünlerinin köklenmesinde Almehdi ve Parfitt ortamı, en iyi sonucu vermiştir. Mikrosürgünlerin % 60’ında köklenme gözlenmiştir (Ainsley ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada ‘Ne Plus Ultra’ , ‘Nonpareil’, ‘Carmel’ ve Parkinson çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo kotiledonlarından rejenerasyon yolları araştırılmıştır. Açık tozlanmış olan ağaçlardan çiçeklenmeden 100-115 gün sonra meyveler toplanmış ve kotiledonların embriyoya yakın olan kısmı kesilerek embriyonun geri kalan kısmı atılmıştır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki TDZ, IBA ve kültürün ilk 7 gün karanlıkta tutulmasının rejenerasyona olan etkileri araştırılmıştır. Sürgün rejenerasyonu, eksplantların 8 hafta 10 µM TDZ ihtiva eden MS ortamında bırakıldıktan sonra 4 hafta hormon içermeyen MS ortamında bekletilmesinde en yüksek bulunmuştur. Kotiledonlardan alınan eksplantların 7 gün karanlıkta tutulması rejenerasyonu teşvik etmiştir. IBA (0.5 µM) ihtiva eden MS ortamında sürgün rejenerasyonu kayda değer bir şekilde düşüş göstermiştir. Optimum kültür şartları altında ‘Nonpareil’, ‘Ne Plus Ultra’, ‘Carmel’ ve ‘Parkinson’ çeşitlerinde elde edilen adventif sürgün rejenerasyonun sırasıyla %73.3, %80.0, %100 ve %86.7 olduğunu belirtmişlerdir (Ainsley ve ark. 2001).

Sert kabuklu meyveler için anaç olma potansiyeline sahip dokuz anacı in vitro koşullarda çoğaltılması için ortam denemeleri kurulmuştur. 1 cm uzunluğunda alınan sürgün uçları 16/8 saat aydınlık/Karanlık fotoperiyot ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Deneme dört farklı ortam (SH, MS, ¾ MS, ve Villegas) ile kurulmuştur.

Ayrıca farklı agar miktarlarının (4.5, 5.5 ve 6.5 g/L) kullanıldığı $\frac{3}{4}$ MS ortamında sürgün oluşumu üzerine etkisine bakılmıştır. Araştırmada eksplantların canlılık oranları, gelişmeleri, kontaminasyon ve kararma oranları kaydedilmiştir. Çoğaltma ortamında en yüksek büyüme, gelişme ve kardeşlenme oranı 5.5 g/L agar içeren $\frac{3}{4}$ MS ortamında tespit edilmiştir (Rodrigues ve ark., 2003).

Nonpareil 15-1, Ne Plus Ultra badem çeşitleri ile badem x şeftali (Titan x Nema-guard) melezi bir anacının in vitro mikroçoğaltımı için yaklaşık 0.7 cm uzunluğundaki 3-5 yapraklı sürgün uçları kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım bakımından 0.049 mM IBA, 3 mM BAP, 0.058 M sakkaroz ve % 0.7 agar içeren AP ortamının da Nonpareil 15-1 genotipinin iyi geliştirdiği Ne Plus Ultra genotipinin ise 0.049 mM IBA, 5 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve % 0,7 agar içeren MS ortamı iyi geliştiği gözlenmiş aynı şekilde Titan x Nema-guard melezi için en iyi ortam 10 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve % 0.7 agar içeren MS ortamının olduğu gözlenmiştir. Köklenme bakımından 2.4 mM IBA, 0.088 M sakkaroz % 0.7 agar içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında 1 hafta karanlıkta ve 2 hafta ışıktaki bekletilen mikrosürgünlerde en iyi köklenmeyi (%88) göstermiştir (Channuntapipat ve ark., 2003).

Şeftali x badem melezi olan Mayor®'un in vitro mikroçoğaltım protokolünün araştırıldığı çalışmada 1.0 mg/L BAP ve 0.1 mg/L IBA içeren 3 farklı ortam (MS, WPM, DKW) ile kendilerinin modifiye ettiği ME ortamı kullanılmıştır. Kültür ortamlarına 30 g/L sukroz ve 7 g/L Bacto Agar Difco eklenmiştir. Mikro çoğaltım aşamasında mikrosürgünlerin yaprak sayısı, sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ve vitrifikasyon (camlaşma) gösteren eksplantların oranı da incelenmiştir. Araştırma sonucunda mikroçoğaltım için en iyi ortamın eksplant başına ortalama 5.21 sürgün ile ME olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, diğer 3 ortamdan alınan çoğalma oranlarıyla karşılaştırıldığında önemli bir fark teşkil etmiştir. Eksplant uzunluğu ve yaprak sayısı da bu ortamda daha fazla olmuş ayrıca vitrifikasyon semptomları daha az görülmüştür.

Kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler bakımından en iyi sonuç 1.0 mg/L ve 1.5 mg/L BAP ile 0.1 mg/L IBA içeren ortamlardan alınmıştır. 1.0 mg/L BAP ve 0.1 mg/L IBA kullanıldığında vitrifikasyon semptomları azalmış ve bu konsantrasyon optimum olarak belirlenmiştir. 2 mg/L GA3 ilave edilmesiyle birlikte eksplant başına sürgün sayısında düşüş olmasına karşın eksplantların boyunda artış olduğu tespit edilmiştir (Cos ve ark., 2004).

GF-677 melez anacının invitro köklendirilmesi üzerine, organik (Fe-EDTA ve Fe-EDDHA) ve inorganik (FeCl₃) demir ilavesinin etkileri incelenmiştir. Demir noksanlığında yada FeCl₃ kullanıldığında köklenme oranı ok düşük olmasına karşın Fe-EDDHA ilave edilmiş ortamdaki eksplantlarda % 100 köklenme sağlanmıştır. Fe-EDTA ilave edilen ortamda kök elde edilememiş ve Fe-EDTA uygulamasından belli bir süre sonra mikrosürgünlerde yapılan analiz sonucunda oldukça az klorofil ve yüksek Fe içeriği göstermiştir (Molassiotis ve ark., 2003).

GF-677 melez anacının invitro köklendirilmesi üzerine farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L) kullanılan B2 (Riboflavin) vitamininin etkisi incelenmiştir. Mikrosürgünler köklenmeye alındıktan 4 hafta sonra tanık uygulamasıyla kıyaslandığında riboflavinin eksplantlarda yan kök oluşumunu teşvik etmediği ve köklenmenin çok düşük olduğu görülmüştür. B2 vitamininin en yüksek (1.5 ve 2.0 mg/L) iki konsantrasyonunu içeren köklenme ortamında, toksik etki oluşmuş ve sürgünlerin büyük bir kısmında, tepe nekrozu ve kloroz semptomları görülmüştür (Antonopoulou ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada PR 204/84 (şeftali x badem) anacının 2,5 mg/L IBA konsantrasyonlu ½ MS ortamında eksplantların köklenme oranının normal MS ortamına göre artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ortalama kök sayısı ve kök uzunluğu 2,5 ve 5 mg/L IBA konsantrasyonlu ½ MS ortamında artış gösterdiğini bildirmişler. IBA konsantrasyonu 0 dan 10 mg/L ye yükseltildiğinde hem ½ MS hem de normal MS ortamında sürgün başına ortalama kök sayısının arttığını bildirmişler. Ortamdaki IBA ve mineral madde miktarının ortalama kök uzunluğu üzerine önemli derecede etki etmediği bildirilmiştir. Yapılan ikinci bir denemede eksplantlar köklenmeye alındıktan sonra 12 gün karanlığa bırakılmış daha sonra 12 günlük standart gelişme şartlarında bekletilmiştir. On iki saat karanlık uygulamasından sonra 12 saat ışıktaki bırakılan eksplantların 1.0 ve 2.5 mg/L IBA konsantrasyonunda 24 saat 16/8 aydınlık/karanlık şartlarına göre daha iyi köklendiği belirlenmiştir (Fotopoulos ve ark. 2005).

Ticari değeri yüksek olan badem çeşitleri (Christo Morto, Ferraduel Ferragnes, ve Nonpareil) ile bademde sıklıkla kullanılan GF 677 anacı için uygun mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesine çalışılmıştır. Araştırma kapsamında MS, WPM, DKW ile NRM ortamının yanında badem tohumunun kompozisyonuna yakın olan modifiye NAM ortamını kullanmışlardır. Mikrosürgünlerde ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün

uzunluğu bakımından en iyi sonuç NAM kültür ortamında elde edilmiştir. Sürgün oluşturma bakımında en iyi sonuç sırasıyla NRM, MS, DKW ve WPM ortamlarında % 69 ,% 68 ,% 49 ve % 35 olmuştur (Nas ve Ark. 2013).



3.MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2018 – 2019 yılları arasında Şırnak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada *Prunus arabica* (Olivier) Meikle badem türünün *in vitro* mikroçoğaltım özellikleri araştırılmıştır.

3.1.Materyal

Çalışmada *Prunus arabica* (Olivier) Meikle badem türünün yeşil sürgünleri kullanılmıştır. Eksplantlar 2018 şubat ayında daha sürmeden Şırnak iline bağlı Cizre ilçesinde bulunan bir araziden temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin arazideki görünümü.

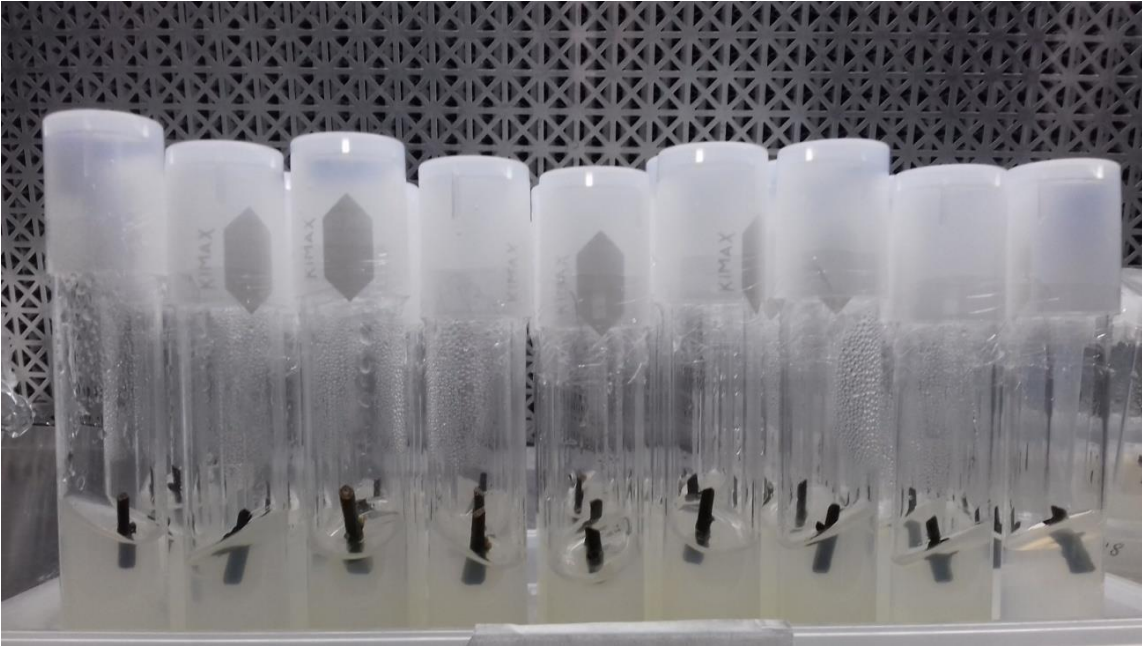
Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinde Kilis, Gaziantep, Adıyaman, Mardin, Şırnak ve Siirt illerinde yetişen çalı formunda yabani bir badem türüdür. *Prunus arabica* Olivier 1,5-2,5 boyunda süpürge benzeri bir çalıdır. Sürgünler ve dallar daima yeşildir. *Prunus arabica* uzun süre susuzluğa ve kuraklığa dayanıklı bir bitkidir. *Prunus arabica* Yakın Doğu bitkisidir ve Ürdün'nün Güneydoğusunda şeftali, nektarin ve diğer sert çekirdekli meyvelerin verimini artırmak için anaç olarak kullanılır.

3.2. Metot

3.2.1. Aşama I: Bitki Materyalinin (eksplant) Yüzeysel Sterilizasyonu

Prunus arabica (Olivier) Meikle'den alınan yeşil çelikler laboratuvar ortamında, akan çeşme suyu altında 2 saat boyunca durulanmışlar. Daha sonra yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuşlardır. Sürgünlerin yüzeysel sterilizasyon işlemi bütün aşamaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Yüzeysel sterilizasyon için yeşil çelikler öncelikle %70 etil alkol (EtOH) içerisinde 30 saniye süreyle bekletilmiş, sonra steril saf su ile iki kez durulanmışlar, en sonra yeşil çelikler litreye 10 damla Tween-20 içeren %20' lik ticari çamaşır suyu solüsyonu içerisinde ara-sıra karıştırılarak 15 dakika bekletildikten sonra üç kez saf su ile durulanmışlar.

Yüzeysel sterilizasyon ve durulama işlemlerinden sonra eksplantlar tek boğum arasından kesilip önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş tek-boğum veya sürgün-ucundan oluşan eksplantlar 25 x 150 mm'lik cam tüpler içerisinde $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Benzyladenine (BA)+ $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Indole -3-butyric acid + $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sukroz içeren ve $5.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar ile jelleştirilmiş NRM (Nas ve Read, 2004a) ortamında kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.1). Dikim işleminden sonra, tüplerin kapakları kapatılmış ve kapakların alt kısımları hava almayacak biçimde şeffaf streç film ile sarılarak herhangi bir enfeksiyona karşı dış ortamdaki atmosferle olan ilişki kesilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Eksplantlar kültüre alındıktan sonra kapakların alt kısımları streç film ile sarılan tüpler.

Çizelge 3.1.Nas ve Read(NRM) (2004), Murashige ve Skoog(MS) (1962), Driver ve Kuniyuki (DKW) (1984), Woody Plant Medium(WPM) Ortamlarının Kimyasal Bileşimi.

Makro Elementler (mg/L)	NRM	MS	DKW	WPM
NH ₄ NO ₃	530	1650	1416	400
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	700		1960	556
CaCl ₂ 2H ₂ O	90	440	147	96
MgSO ₄ 7H ₂ O	1600	370	740	370
KNO ₃	550	1900		
KH ₂ PO ₄	1300	170	259	170
K ₂ SO ₄			1560	990
Mikro Elementler (mg/L)				
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	4,8	6,2
CuSO ₄ 5H ₂ O	2,5	0,025	0,25	0,25
MnSO ₄ H ₂ O	20	16,9	33,5	22,3
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2,5	0,25	0,39	0,25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,8	8,6		8,6
Zn(NO ₃).6H ₂ O			17	
Sequestrene 138 Fe	100			
FeSO ₄ .7H ₂ O		27,8	33,4	27,8
Na ₂ EDTA		37,3	44,7	37,3
KI		0,83		
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,025		
Vitaminler (mg/L)				
Thiamine (B1)	0,6	0,1	2	1
Riboflavin (B2)	0,21			
Nicotinic acid (B3)	1,15	0,5	0,5	0,5
Pyrodoxine (B6)	0,6	0,5	0,5	0,5
Vitamin E (a-tocopherol)	20			
Vitamin C (Ascorbic acid)	1			
Glycine	0,85	2	2	2
Myo-inositol	200	100	100	100
Sucroze	30 g/L	30 g/L	20 g/L	20 g/L
Agar	5,5	5,5	5,5	5,5

Eksplantlar *In vitro* kültür ortamına alındıktan sonra, kültürler her gün kontrol edilmiş ve kültür ortamlarında meydana gelen eksplant ölümleri, kararma ve mikrobiyal bulaşmalara ait gözlemler alınmıştır. Dört hafta sonunda, mikrobiyal bulaşmadan ari ve sağlıklı görünen eksplantlar alt kültüre alınmışlardır. Aşama II için mikrobiyal bulaşmadan ari yeterli sayıda ekplant elde etmek için eksplantlar her dört-haftada-bir alt kültüre alınmışlardır. Bu işlem beş (5) kez tekrarlanmış ve daha sonra aşama II için ortam hazırlamaya çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.3).

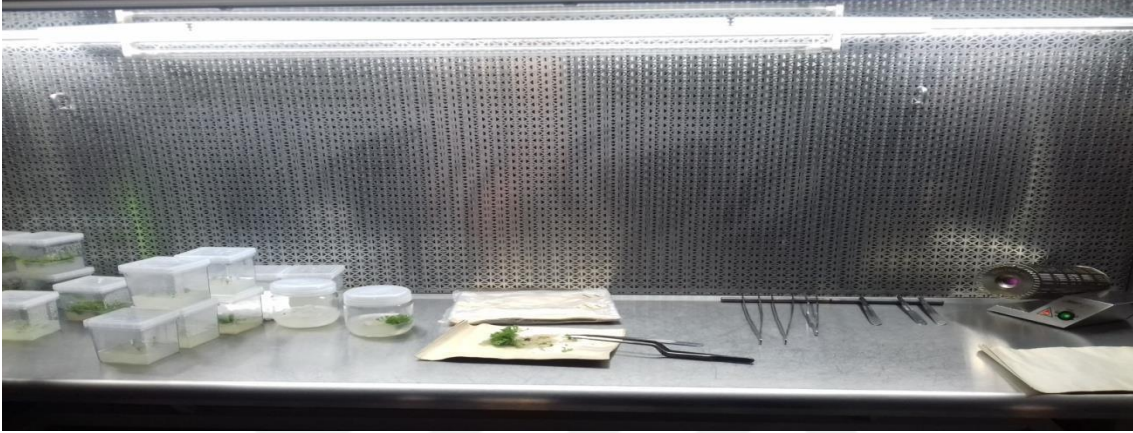


Şekil 3. 3. Labaratuvarıda Ortam Hazırlama Çalışmaları

3.2.2. Besin Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Hazırlanan besin ortamı, çalışmada kullanılan magenta kapları veya cam şişeler, pensler, bistüriler ve kurutma kağıtları 121 °C’de, 1 atm. basınç altında, 15 dakika süre ile otoklavda sterili edilmiştir.

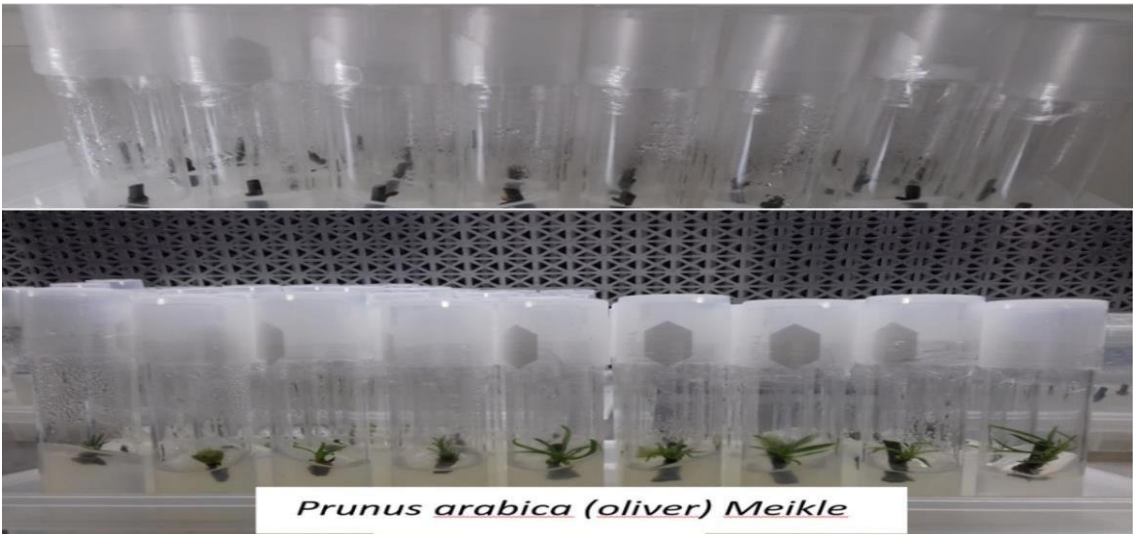
Çalışmaya başlamadan en az 30 dakika önce steril kabin çalıştırılmış ve içi % 70’lik etil alkol ile temizlendikten sonra kabinde çalışmaya başlanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Steril kabin içerisinde mikrosürgünlerin bir alt kültüre alınması.

3.2.3. Kültür Şartları

Bu çalışmada kullanılan iklim odasının ışık yoğunluğu 2.500-3.000 lüks’e ayarlanmış olup, tüplere aktarılan eksplantlar (kültürler) 23 ± 2 °C sıcaklığa sahip iklim odasında 16/8 ışık/karanlık fotoperiyot altında büyümeye bırakılmışlardır. İklim odasının sıcaklığı klima ile sağlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kültüre alınmış ve süren eksplantlar.

3.2.4. Sürgün Ucu ve Lateral Eksplantlarının Başlangıç Ortamında Kültüre Alınması

Yüzeysel sterilizasyonu tamamlanan yeşil çelikler tek boğum arasından kesildikten sonra cam tüplere aktarılmıştır. 4 haftanın sonunda bulaşma göstermeyen (kontamine olmayan) sürgün veren eksplantlardan sürgünler alınıp magenta kaplarına herbirine 4'er adet sürgün olacak şekilde yerleştirilmiştir. Boğum eksplantları, başlangıç kültür ortamında rejenerasyon denemelerinde kullanılabilirlik şekil ve sayıda yaprak ve sürgün elde edilinceye kadar 3-4 haftalık aralıklarla alt kültüre alınmıştır.

Sürgün çoğaltımının sağlanması için, yeni elde edilen sürgün kümecikleri bireysel sürgünler şeklinde ayrılarak taze kültür ortamına transfer edilmiştir. Başlangıç kültür ortamı olarak kullanılan, 1 mg/L benziladenin (BA), 0.01 mg/L IBA (İndol 3 bütirik Asit), 30 g/L sukroz, 5.5 g/L agar, mineral ve vitaminleri içeren NRM (Nas ve Read, 2004a) kültür ortamının pH'sı, otoklavlanmadan hemen önce 5.5'e 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan kültür ortamı 121 °C' de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.5. *In Vitro* Sürgün Çoğaltımı ve Çevre Koşulları

Eksplantlar, sürgün kültür ortamında rejenerasyon denemelerinde kullanılabilirlik şekil ve sayıda yaprak ve sürgün elde edilinceye kadar 3'er haftalık aralıklarla aynı sürgün kültür ortamında alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.6). Sürgün kültürünün devamının sağlanması için, yeni elde edilen sürgün kümecikleri bireysel sürgünler şeklinde ayrılarak taze sürgünler kültür ortamına aktarılmıştır. Sürgün kültür ortamı, mineral ve vitaminleri içeren Nas ve Read (NRM), 1 mg/L benziladenin (BA), 0.01 mg/L İndolbütirik Asit (IBA), 30 g/L sukroz ve 5.5 g/L agar dan oluşmuştur. Kültür ortamının pH'sı, sterilizasyondan önce 5.5'e 1 N HCl veya NaOH ile ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan kültür ortamı 121 °C de 15 dk steril edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan iklim odasının ışık yoğunluğu 2500- 3000 lüks, 16 saat ışık 8 saat karanlık ortam sıcaklığı ise 24 °C ' e ayarlanmıştır.



Şekil 3. 6. Alt kültüre alınmış eksplantlar.

Eksplantlar *In vitro*'ya alındıktan sonra, kültürler günü birlik kontrol edilerek meydana gelen eksplant ölümleri, kararma ve mikrobiyal bulaşmalar belirlenmiştir (Şekil 3.7). Üç hafta sonunda, mikrobiyal bulaşmadan arî ve sağlıklı görünen eksplantlar alt kültüre alınmışlardır (Şekil 3.8). Mikrobiyal bulaşmadan arî, yeterli sayıda eksplant elde etmek için eksplantlar her üç haftada bir alt kültüre alınmışlardır.



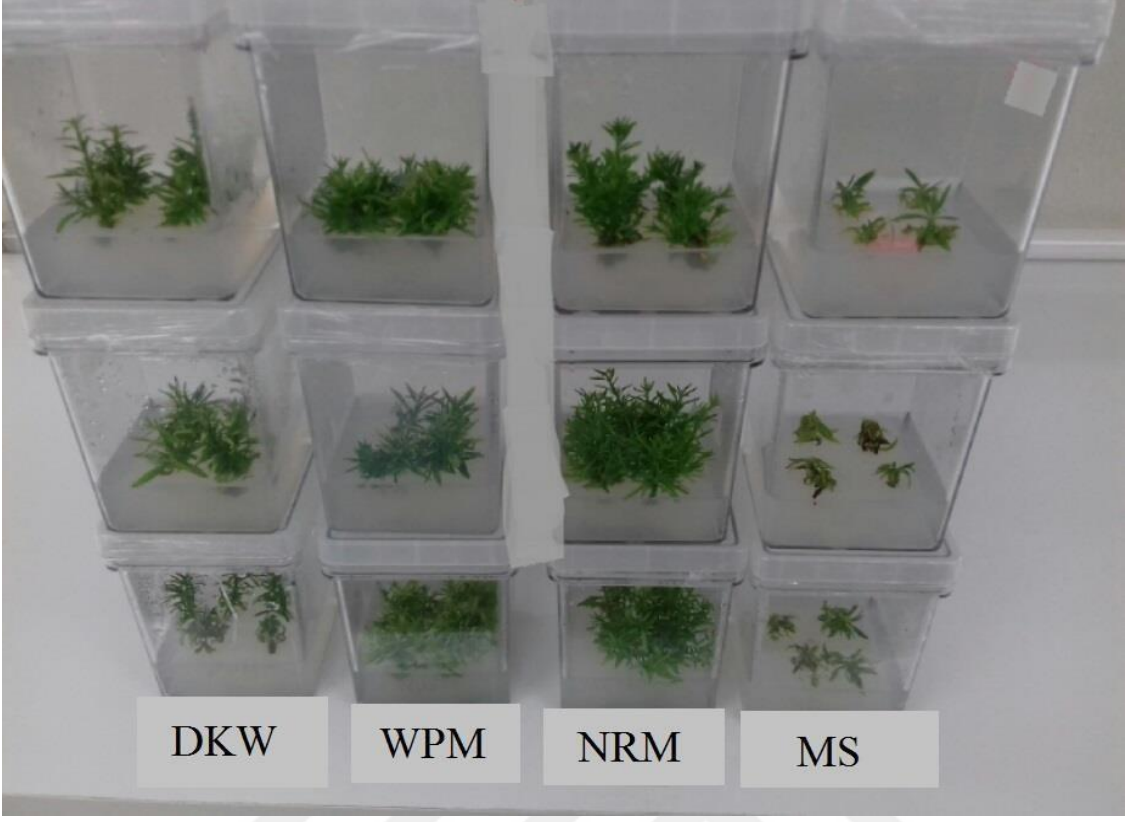
Şekil 3. 7. Alt kültüre alındıktan sonra bulaşma görülen eksplantlar.



Şekil 3. 8.Mikrobiyal bulaşmadan arî ve sağlıklı görünen eksplantlar.

3.2.6.Eksplant Başına Sürgün Sayısı ve Sürgün Uzunluğu İçin Uygun Ortamın Belirlenmesi

NRM (Nas ve Read) besin ortamında kültüre alınan bitkilerden 1-1,5 cm üzerinden alınan sürgün ucu eksplantlar, kültürlerin *in vitro*'da sürdürülebilirliğini, stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak kültür ortamını belirlemek amacıyla, Aşama I'den alınan eksplantlar 1.0 mg/L BA + 0.01 mg/L IBA + 5.5 g/L agar (Merck 1.016.13) içeren NRM, MS ve WPM ve DKW ortamları üzerinde altkültüre alınmışlardır. Eksplantlar, 70 ml besin ortamı içeren magentalara aktarıldıktan sonra magentaların kapakları kapatıldı ve kapakların alt kısımları şeffaf streçfilm ile sarılıp iklim odasına bırakıldı. Dikimden sonra bitkiler ara ara kontrol edildi ve dört haftanın sonunda *Prunus arabica* (Olivier) Meikle badem türünün *in vitro* mikro çoğaltımını sağlayacak en iyi kültür ortamı belirlenmeye çalışıldı. Çalışmada en iyi gelişmeyi (kardeşlenme, sürgün uzunluğu ve bitki canlılığı) incelemek için dört ortam, her bir ortamda üç magenta ve her magenta kabında dört bitkicik olacak şekilde üç tekrürlü olarak incelendi (Şekil 3.9).

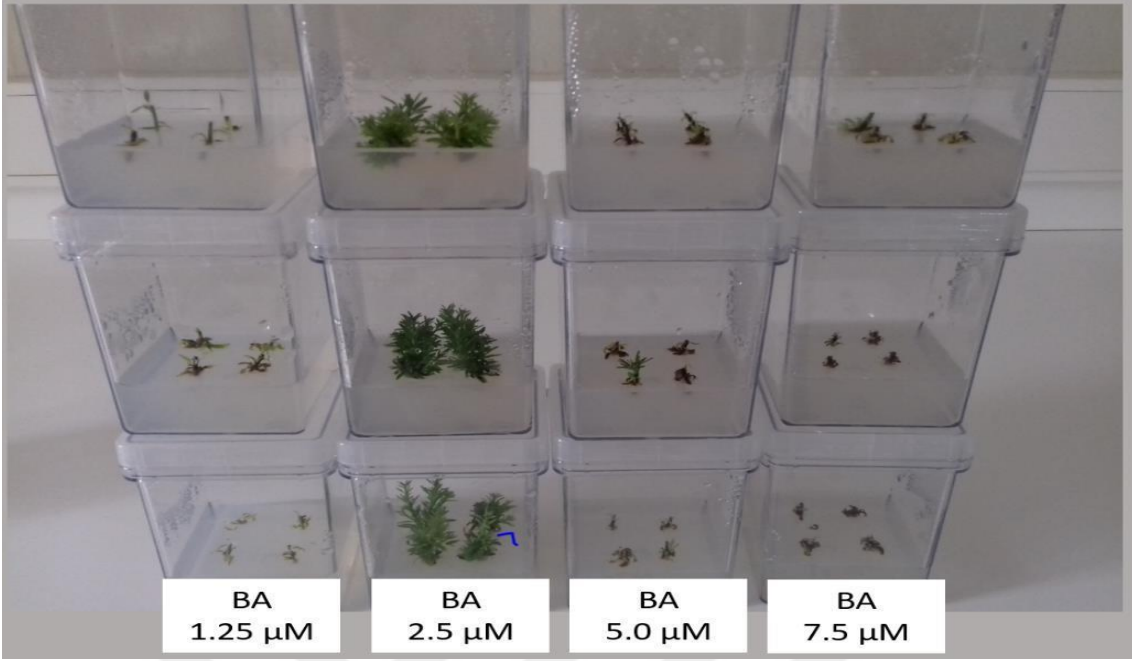


Şekil 3.9. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle 'nin farklı kültür ortamlarındaki görünümü.

3.2.7. Sürgün Gelişimi

3.2.7.1. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun BA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

En iyi BA konsantrasyonu belirlemek amacıyla eksplantlar farklı konsantrasyonlarda BA (1.25; 2.5; 5.0 ; 7.5 μ M) ve 0.01 mg/L IBA içeren NRM besin ortamında kültüre alınmışlardır. Ortamın katılaştırılması için ve 5.5 g/L agar ilave edilmiştir. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş ve her muamele için 4 tekerrür (her tekerrür 4 magenta ve her magentada dört bitki) kullanılmıştır. Bütün deneme iki kez tekrarlanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin farklı BA konsantrasyonlarındaki gelişimi.

3.2.7.2. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun TDZ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

En iyi TDZ konsantrasyonunu belirlemek amacıyla eksplantlar TDZ nin farklı konsantrasyonlarını (1.25; 2.5; 5.0 ; 7.5 µM) ve 0.01 mg/L Indole-3- butyric acid + 30 mg/L sukroz ve 5.5 g/L agar içeren Nas ve Read (NRM) ortamında kültüre alınmışlardır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş ve her muamele için 4 tekerrür (her tekerrür 4 magenta ve her magentada dört bitki) kullanılmıştır. Bütün deneme iki kez tekrarlanmıştır. Alt kültür boyunca bitkilerin canlılığı, kallus oluşumu, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı incelenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle 'nin farklı TDZ konsantrasyonlarındaki gelişimi.

3.2.7.3. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun Meta-Topolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

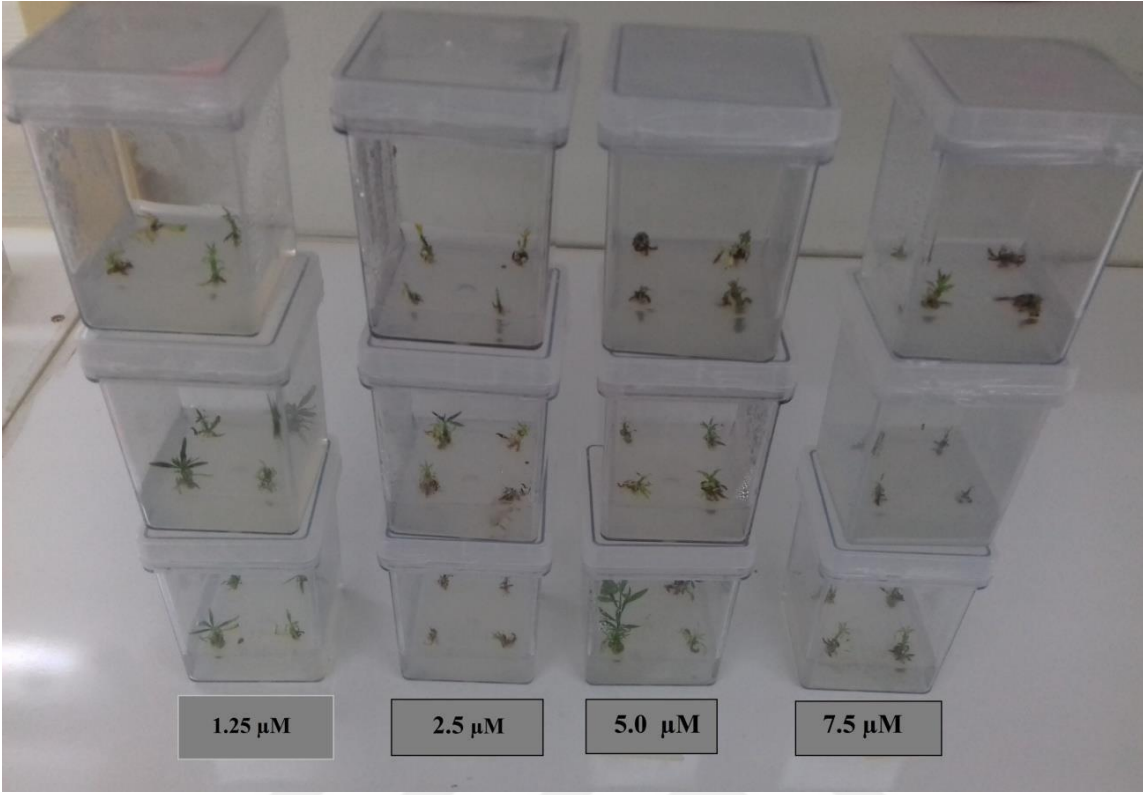
En iyi Meta-Topolin konsantrasyonu belirlemek amacıyla eksplantlar Meta-Topolinin farklı konsantrasyonlarını (1.25; 2.5; 5.0 ; 7.5 μM) ve 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Indole-3-butyric acid + 30 mg/L sukroz ve 5.5 g/L agar içeren Nas ve Read (NRM) ortamında kültüre alınmışlardır. Araştırma tesadüf parselleri denemesine göre düzenlenmiş ve her muamele için 4 tekerrür (her tekerrür 4 magenta ve her magentada dört bitki) kullanılmıştır. Bütün deneme iki kez tekrarlanmıştır. Alt kültür boyunca bitkilerin canlılığı, kallus oluşumu, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısına ait gözlemler alınmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin farklı Meta-Topolin konsantrasyonundaki gelişimi.

3.2.7.4. Sürgün Gelişimi Üzerine Uygun 2-İP Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sürgün gelişiminde en iyi 2-İP konsantrasyonu belirlemek amacıyla eksplantlar 2-İP nin farklı konsantrasyonlarını (1.25; 2.5; 5.0 ; 7.5 μM BA) ve 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Indole-3-butyric acid + 30 mg/L sukroz ve 5.5 g/L agar içeren Nas ve Read (NRM) ortamında kültüre alınmışlardır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş ve her muamele için 4 tekerrür (her tekerrür 4 magenta ve her magentada dört bitki) kullanılmıştır. Bütün deneme iki kez tekrarlanmıştır. Alt kültür boyunca bitkilerin canlılığı, kallus oluşumu, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısına ait gözlemler alınmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle 'nin farklı 2-İP konsantrasyonlarındaki gelişimi.

3.2.8. Köklendirme

3.2.8.1. IBA 'nın Köklenme Üzerine Etkisi

Yukarıda sözü edilen kriterlere göre en iyi mikroçoğaltımın olduğu BA konsantrasyonunun belirlenmesinden sonra, eksplantler sadece 1.0 mg-L^{-1} BA + 0.01 mg-L^{-1} IBA içeren NRM besin ortamı üzerinde altkültüre alınmıştır. Bu işleme 2 alt kültür boyunca devam edilmiştir.

Alt kültür periyodunun sonunda sürgün uzunluğu 1.5 cm veya daha fazla uzunluğa sahip olan mikrosürgünler köklendirme için kullanılmıştır. Köklendirme için 0.5; 0.25; 0.125; 1.0 mg/L IBA, NRM kültür ortamı kullanılmıştır. Köklendirme ortamı içeren her Magentaya altı mikrosürgün dikilmiş ve $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklığa sahip iklim odasında 16/8 ışık/karanlık fotoperiyot altında köklenmeye bırakılmıştır. Köklendirme denemesi üç kez tekrarlanmıştır. Dört haftanın sonunda köklenme verileri alınmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle 'nin dört farklı IBA konsantrasyonlarına aktarımı.

3.2.8.2. Aktif Kömürün Köklenme Üzerine Etkisi

Altkültür periyodunun sonunda sürgün uzunluğu 1.5 cm veya daha fazla uzunluğa sahip olan mikrosürgünler köklendirme için kullanılmıştır. Bu mikrosürgünler 0.25; 0.50; 0.75 ve 1.0 mg/L aktif kömür konsantrasyonlarını NRM besin ortamında kültüre alınmışlardır. Her konsantrasyon için üç magenta kutusu olup her magenta kutusunda da altı bitki olacak şekilde incelendi.

3.2.9. Pişkinleştirme ve Dış Koşullara Alıştırılması

İn vitro koşullarda çoğaltılan mikrosürgünlerin yaprak porları açık olduğundan dolayı direkt dışarıya aktarıldıklarında kuruma gösterirler. Bu sorunu çözmek için mikrosürgünlerin köklendirilmesi ve kademeli olarak dış koşullara aktarılması gerekmektedir. Bu işlem Nas ve Read (2004b)'e göre yapılmıştır. 30 günlük köklendirme denemesi sonucu köklenen mikrosürgünlerin kökleri besin ortamından temizlemek için akan çeşme suyu altında kökler zarar görmeyecek şekilde yıkanmıştır. Kök yıkama

işleminde sonra mikro sürgünler torf ve perlit karışımıyla doldurulmuş pet şişelere aktarılmıştır. Ortam nispi neminin kaybolmaması ve mikrosürgünlerin kurumaması için pet bardakların üzeri şeffaf pet bardağı ile kapatılmıştır. İklim odasına (23 ± 2 °C, 16 /8 (ışık/karanlık) konulan bitkilerin pişkinleşmesi için ikinci haftadan sonra pet bardakların üzerinde 5 delik açılmıştır. Bu şekilde ortamdaki nispi nemin tedrici olarak düşmesi sağlanmış ve yaklaşık bir ay sonra pet bardak tamamen kaldırılmıştır. Daha sonra mikro sürgünler sera ortamında büyüme bırakılmıştır.

Bütün aşamalarda verilerin analizinde SPSS 20 istatistik programı kullanılarak General Linear Model (GLM) ile ($p=0.05$) varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farkların belirlenmesinde TUKEY testi kullanılmıştır.



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Genel Gözlemler

Bitkilerin *in vitro* çoğaltımında karşılaşılan zorluklardan biri de başlangıçta ve çoğaltım aşamasında karşılaşılan mikrobiyal kirliliklerden kaynaklanan kontaminasyonlardır. Bu nedenle, çalışmada yapılacak ilk ve en önemli aşama kullanılacak olan bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonun yapılmasıdır ve bunun için en uygun sterilizasyon metoduna karar verilmesidir. Yüzeysel sterilizasyonun başarısının bitkinin büyüdüğü ortam, türü, yaşı, mikro çoğaltımda kullanılan bitki kısmına ve alınan eksplantlarının yüzeysel sterilizasyon seviyesine bağlı olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Sathyanarayana ve Varghese 2007; Wolella 2017).

Çalışmada kullanılan eksplantların yüzeysel sterilizasyon işlemi steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Eksplantların Yüzeysel sterilizasyonu için bir litreye 3-5 damla Tween-20 ilave edilerek hazırlanan %30'luk ticari çamaşır suyu (hypo) içerisinde ara sıra karıştırılarak 15 dakika bekletildikten sonra steril saf su ile üç kez durulanmışlardır. Kültüre alındıktan birkaç gün sonra kültürlerde belli oranda kontaminasyona rastlanmıştır. Daha sonraki alt kültürlerde mikrobiyal (bakteriyel ve fungal) bulaşmalar ara sıra görülmüştür. Bu bulaşlıkların çalışma hatalarından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

4.2.Farklı Kültür Ortamlarının (NRM, WPM,MS,DKW) Stabilizasyonu ve *Prunus arabica*'nın Gelişimi Üzerine Etkisi

Kültürlerin *in vitro*'da stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak BA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, çeşitler 1 mg/L BA ve 0.01 mg/L IBA içeren NRM ortamında kültüre alınmış ve dört (başlangıç dahil beş) altkültürün sonunda eksplantlar 1.05 mg/L BA + 0.01 mg/L IBA + 5.5 g/L agar (Merck 1.016.13) içeren NRM, MS ve WPM ve DKW ortamları üzerinde üç kez alt kültüre alınmışlardır. Kültüre alındıktan bir ay sonra (4 hafta) sürgün sayısı ve sürgün uzunlukları ölçülmüştür. İstatiksel analizde, bir eksplantan oluşan sürgün sayısı ve bu sürgünlerin uzunluğu değerlendirmeye alınmıştır.

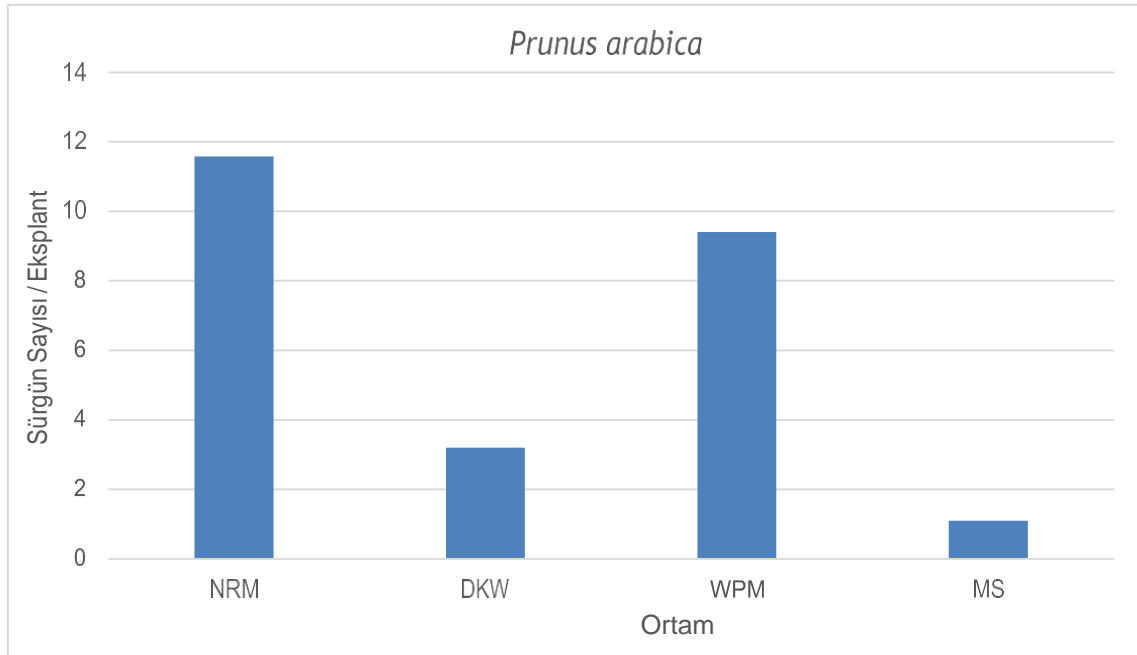
Çizelge 4. 1. Farklı kültür ortamlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.

Kaynak	SD	KO	F
Ortam	3	224,113	135,47**
Tekerrür	1	0,11761	0,21 ^{öd}
Ortam*tekerrür	3	3,28184	1,98 ^{öd}

ÖD: Ortalamalar arasındaki fark $p=0.05$ seviyesinde önemli değil; *, **: ortalamalar arasındaki fark, *Sırasıyla* $p=0.05$ ve $p=0.005$ seviyesinde önemli

Sürgün sayısı bakımından farklı ortamlar incelendiğinde ortamın sürgün sayısı üzerine etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Tekerrürler arasında bir fark gözlenmediği aynı şekilde Ortam*tekerrür interaksiyonunun sürgün sayısı üzerinde etkisinin önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından kültür ortamının bileşimi etkili bulunmuştur. NRM üzerinde bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı ile MS ve WPM ve DKW üzerinde bir eksplanttan meydana gelen sürgün sayısı arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bir eksplantten oluşan ortalama sürgün sayısı NRM ortamı için 11,58 adet WPM için 9.4 adet DKW ortamı için 3.22 adet ve MS ortamı için 1.3 adet bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün sayısı.

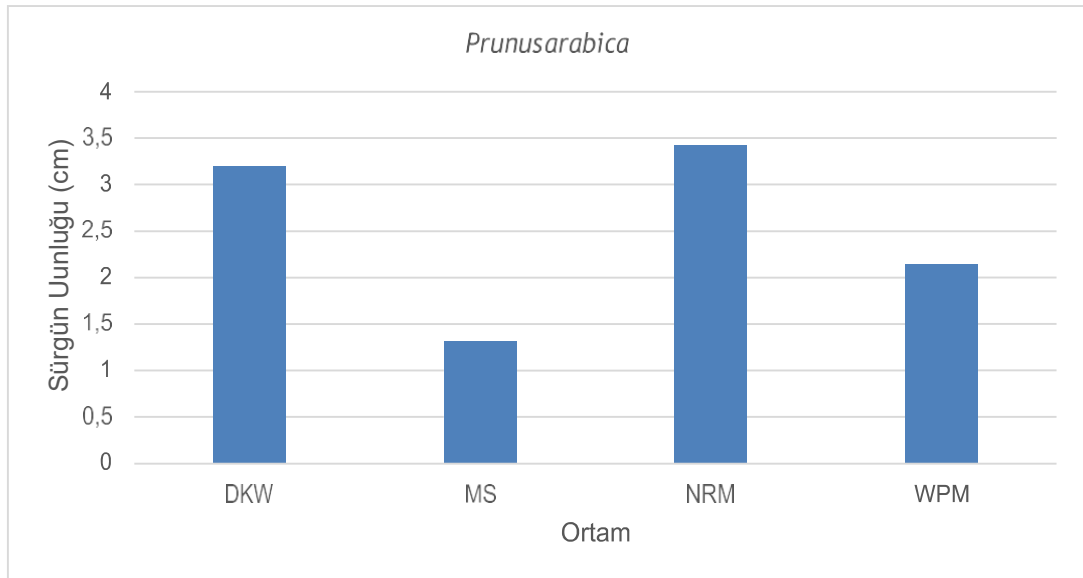
Sürgün Uzunluğu bakımından farklı kültür ortamları incelendiğinde ortamın sürgün uzunluğu üzerine etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Tekerrürler arasında bir fark gözlenmediği aynı şekilde Ortam*tekerrür interaksiyonunun sürgün sayısının üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. Ortam ve Tekerrürün sürgün uzunluğu üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.

Kaynak	SD	KO	F
Ortam	3	8,710625	140,32**
Tekerrür	1	0,10125	4,89 ^{öd}
Ortam x Tekerrür	3	0,33145	5,33*

ÖD.: Ortalamalar arasındaki fark $p=0.05$ seviyesinde önemli değil; *, **: ortalamalar arasındaki fark, Sırasıyla $p=0.05$ ve $p=0.005$ seviyesinde önemli

Eksplant başına oluşan sürgünlerin uzunlukları bakımından kültür ortamının bileşiminin etkili olduğu bulunmuştur. NRM üzerinde bir eksplanttan meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları ile MS, WPM ve DKW üzerinde bir eksplanttan oluşan ortalama sürgünlerin uzunlukları arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bir eksplanttan oluşan sürgünlerin ortalama uzunluğu NRM ortamı için 3.43 cm DKW ortamı için 3.20 cm, WPM ortamı için 2.14 cm ve MS ortamı için 1.31 cm bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün uzunluğu.

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından uygun kültür ortamı belirlendikten sonra sürgün uzunluğu üzerine en iyi sitokin bileşiminin etkisini öğrenmek amacıyla farklı sitokin (BA, 2İP, mT, ve TDZ) türevlerinin *Prunus arabica* (Oliver) Meikle'nin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine etkisi incelenmiştir.

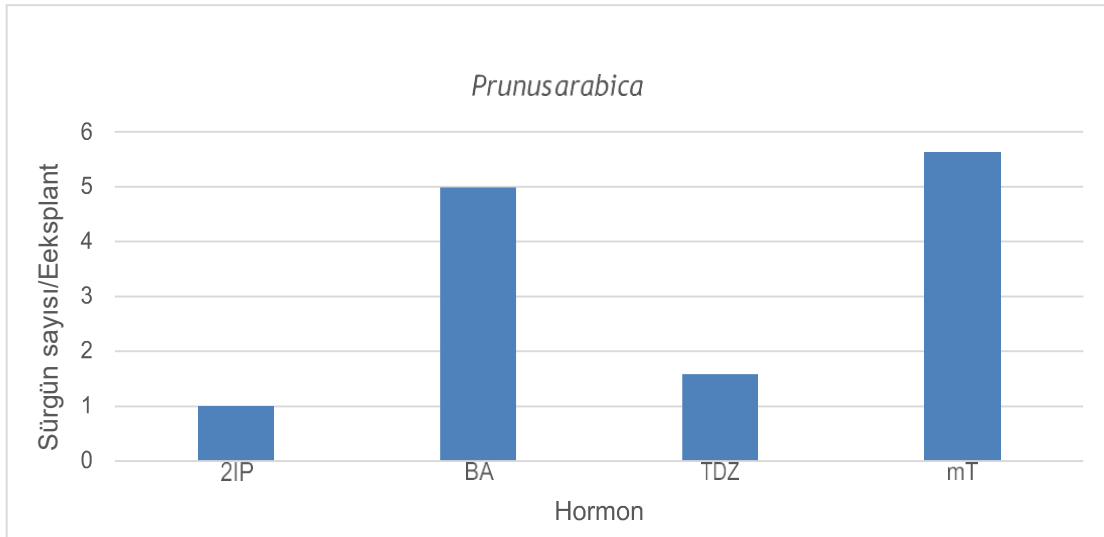
Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından bitkisel hormonun çeşidi ve konsantrasyonunun etkisi önemli bulunmuştur. Tekerrürler arasındaki fark önemsiz bulunmuş Hormon*Konsantrasyon interaksyonunun sürgün sayısı üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. Farklı Hormon konsantrasyonlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.

Kaynak	SD	K.O	F
Hormon	3	199,36449	57,526**
Konsantrasyon	3	94,21447	27,1853**
Tekerrür	2	2,16341	0,9364 ^{öd}
Hormon*Konsantrasyon	9	288,54276	27,7527**
Hormon*Konsantrasyon*Tekerrür	18	29,10383	1,3996 ^{öd}

Ö.D.: Ortalamalar arasındaki fark p=0.05 seviyesinde önemli değil; *, **: ortalamalar arasındaki fark, sırasıyla, p=0.05 ve p=0.005 seviyesinde önemli.

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından BA, 2İP, mT ve TDZ arasındaki fark önemli bulunmuş. Bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç eksplant başına 5.63 adet ile mT(Meta Topoloin) varlığında elde edilmiştir. Bunu sırası ile 4.99 ile BA, 1.59 ile TDZ ve 1 sürgün ile 2 İP izlemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün sayısı.

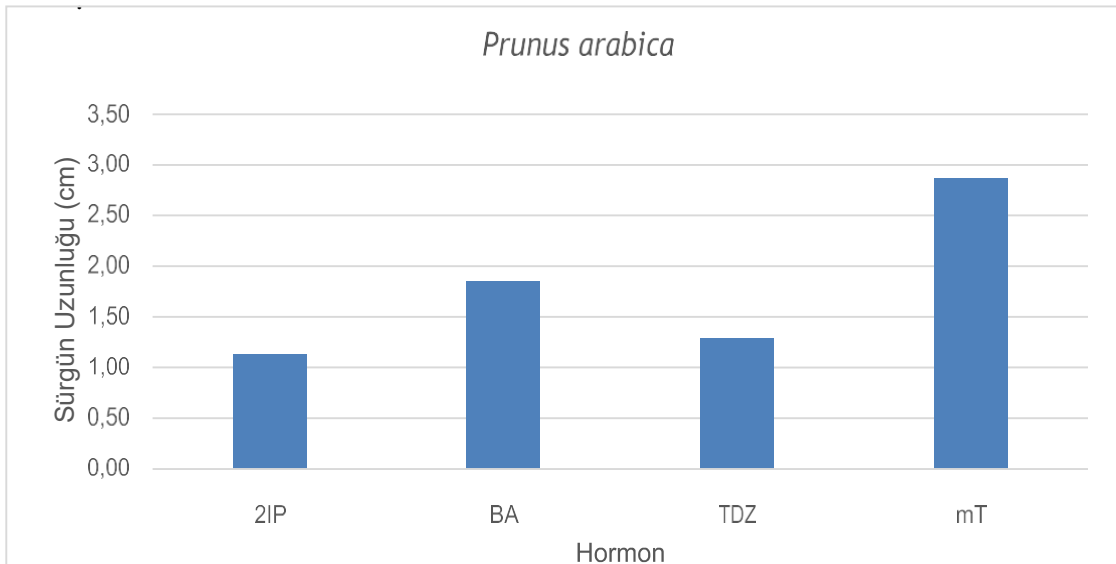
Sürgün uzunluğu bakımından farklı kültür ortamları incelendiğinde ortamın sürgün uzunluğu üzerindeki etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Tekerrürler arasında bir fark gözlenmediği aynı şekilde Ortam*tekerrür interaksiyonunun sürgün sayısı üzerinde etkisinin önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Farklı Hormon konsantrasyonlarının sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.

Kaynak	SD	KO	F
Hormon	3	21,988173	37,0271**
Konsantrasyon	3	0,851806	1,4344*
Tekerrür	2	0,907554	2,2924 ^{öd}
Konsantrasyon*Hormon	9	5,103419	2,8646*
Konsantrasyon*Hormon*tekerrür	18	1,712288	0,4806 ^{öd}

Ö.D.: Ortalamalar arasındaki fark p=0.05 seviyesinde önemli değil; *, **: ortalamalar arasındaki fark, sırasıyla, p=0.05 ve p=0.005 seviyesinde önemli.

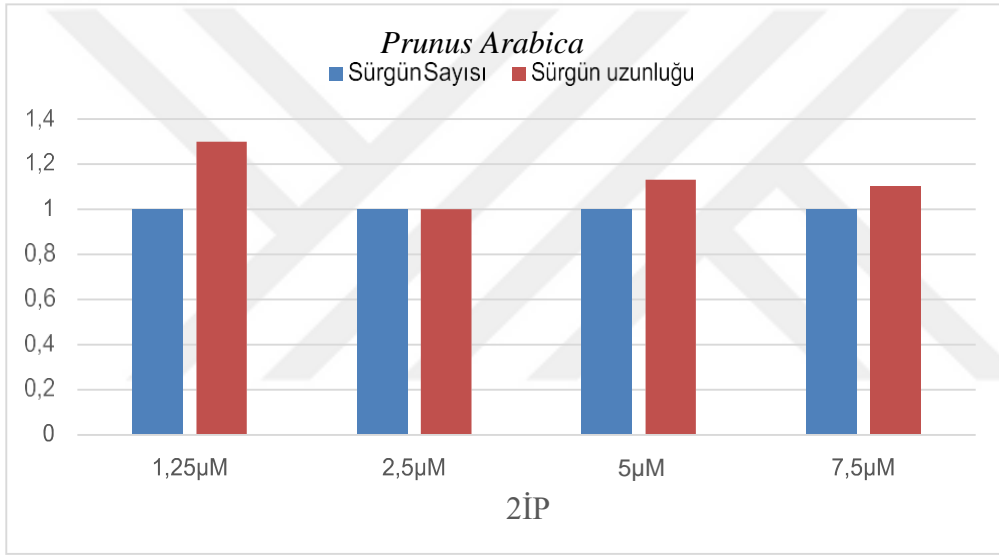
Eksplant başına oluşan sürgünlerin ortalama uzunlukları bakımından farklı sitokininler karşılaştırıldığında en uzun sürgün 2.86 cm ile mT (Meta Topolin) ihtiva eden NRM ortamında elde edilmiştir. Bunu sırası ile 1.85 cm ile BA, 1,29 cm ile TDZ ortamında elde edilmiştir. En kısa sürgün uzunluğu ve 1.13 cm ile 2İP ihtiva eden ortamdanda elde edilmiştir (Şekil 4.4) .



Şekil 4. 4. Farklı hormon bileşimine bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları.

NRM ortamında 2İP hormonunun farklı konantrasyonunun sürgün sayısı üzerine etkisine bakıldığında eksplant başına sürgün sayısı bakımından konsantrasyonlar arasında fark gözlenmemiş ve bütün konsantrasyonlarda eksplant başına ortalama sürgün sayısı bir olarak belirlenmiştir. Özellikle 2İP varlığında eksplantlar iyi bir gelişme göstermemiş ve ortama konulan eksplantlardan herhangi bir kardeşlenme elde edilememiştir.

Sürgün uzunluğu bakımından 2İP nin farklı konsantrasyonları arasında hafif fark olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En Uzun sürgün 1.3 cm ile 1.25 μ M 2İP konsantrasyonunda elde edilmiş bunu sırası ile 1,13 cm ile 5 μ M'lık 2İP onsantrasyonunda elde edilmiştir. 2,5 ve 7,5 μ M'lık 2İP konsantrasyonlarda herhangi bir uzama olmamıştır (Şekil4.5).

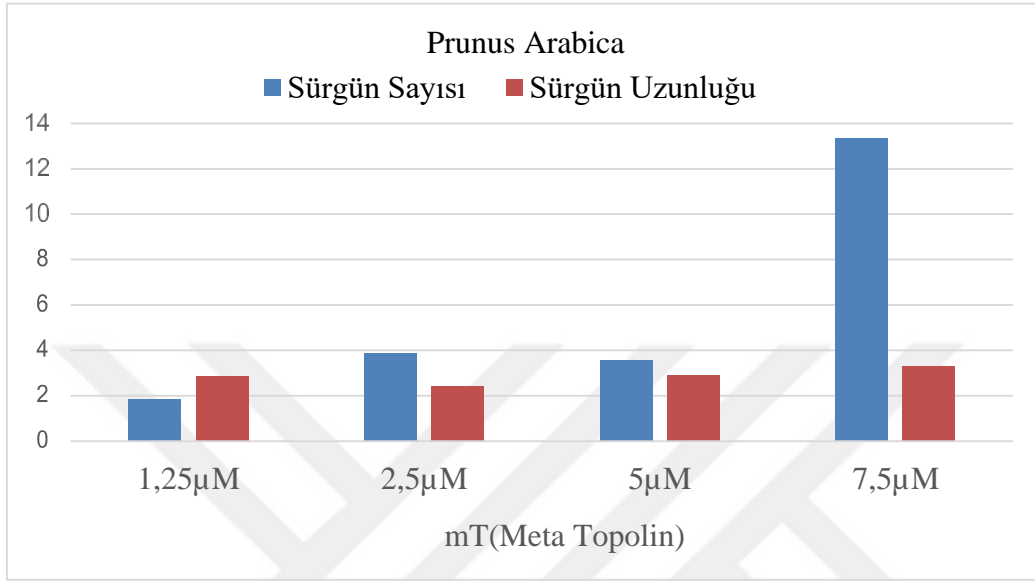


Şekil 4. 5. Farklı NRM ortamında farklı 2İP konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu.

Meta-Topolin hormonunun farklı konantrasyonunun sürgün sayısı üzerine etkisine bakıldığında eksplant başına sürgün sayısı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Eksplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından 13.3 ile en iyi sonucu 7.5 μ M Meta-Topolin içeren ortam üzerinde elde edilmiştir. Bunu sırası ile 3,88 ile 2.5 μ M ve 3,56 ile 5 μ M Meta-Topolin konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Diğer bütün sitokin konsantrasyonlarına oranla en iyi sonucu Meta-Topolin vermiştir.

Sürgün uzunluğu bakımından Meta-Topolinin farklı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Sürgün uzunlukları bütün

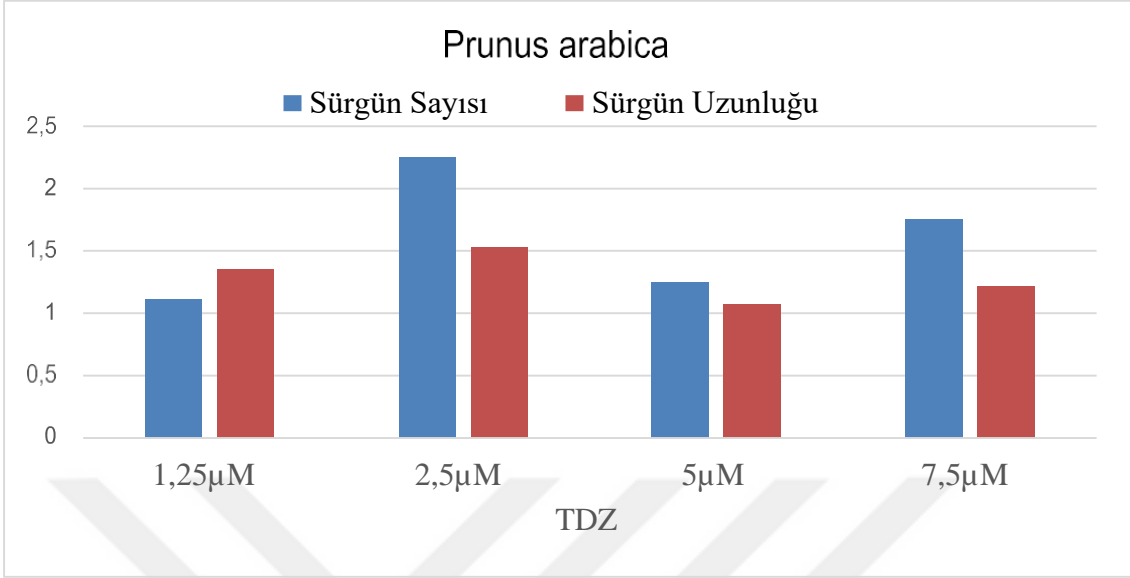
konsantrasyonlarda birbirine yakın çıkmıştır. En Uzun sürgün 3,31 cm ile 7.5 µM konsantrasyonunda elde edilmiş en kısa sürgün ise 2,41 ile 2.5 µM konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. NRM ortamında farklı MT konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu.

NRM ortamında TDZ hormonunun farklı konsantrasyonunun sürgün sayısı üzerine etkisine bakıldığında konsantrasyon düzeyleri ve genel anlamda Meta-Topolin ve BA hormonunun konsantrasyonları kadar etkili olmadığı ancak 2İP hormonundan daha etkili olduğu bulunmuştur. Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından konsantrasyonlar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P \leq 0.05$). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç 2,25 sürgün ile 2.5 µM konsantrasyonundan elde edilmiştir. En düşük ortalama 1.11 sürgün ile 1.25 µM konsantrasyonlu ortamda elde edilmiştir.

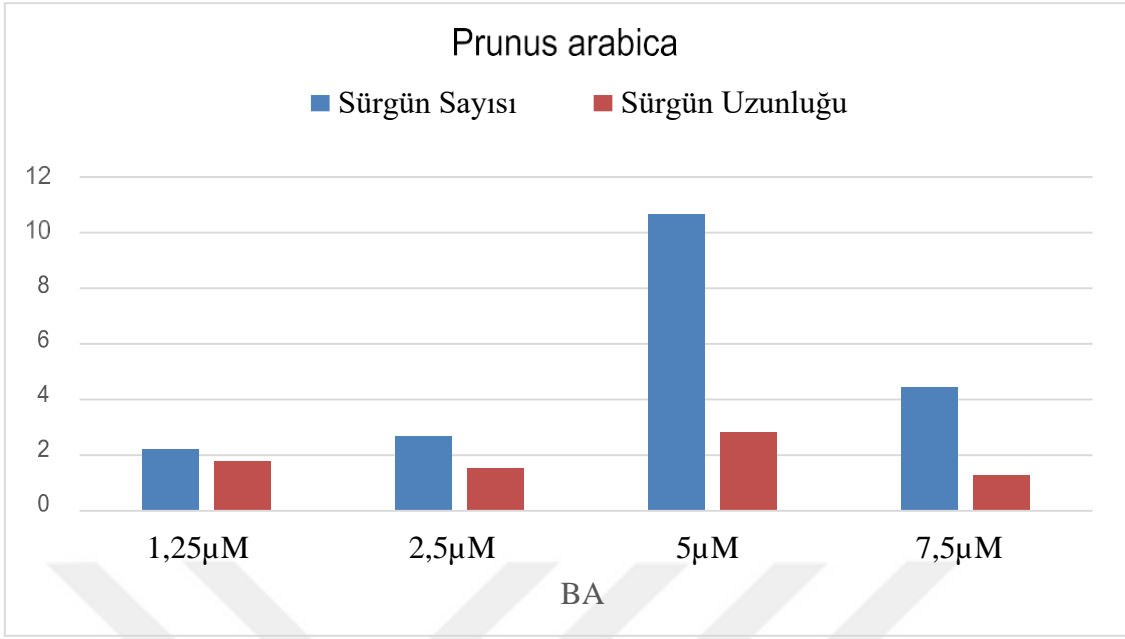
Sürgün uzunluğu bakımından TDZ nin farklı konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P \leq 0.05$). En uzun ortalama sürgün 1.53 cm ile 2,5 µM konsantrasyonunda elde edilmiş bunu sırası ile 1,35 cm ile 1.25 µM, 1.21 cm ile 7,5 µM ve 1,07 cm ile 7,5 µM konsantrasyonlu ortamlar izlemiştir (Şekil 4.7). TDZ kullanımının sürgün sayısından ziyade daha çok kallus oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir. Özellikle 2,5 µM e daha yüksek konsantrasyonlarda özellikle aşırı bir kallus oluşumu gözlemiştir.



Şekil 4. 7. NRM ortamında farklı TDZ konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu.

NRM ortamında BA hormonunun farklı konsantrasyonunun sürgün sayısı üzerine etkisine bakıldığında konsantrasyon düzeyleri arasında istatistiki olarak fark önemli çıkmıştır ($P \leq 0.05$). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç 10,66 sürgün ile 5 µM konsantrasyonundan elde edilmiştir. Bunu 4,43 sürgün ile 7,5 µM, 2,66 sürgün ile 2,5 µM ve 2,22 sürgün ile 1,25 µM konsantrasyonlu ortam izlemiştir (Şekil 4.8).

Sürgün uzunluğu bakımından BA'nın farklı konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P \leq 0.05$). En uzun ortalama sürgün 2,83 cm ile 5,0 µM konsantrasyonunda elde edilmiş bunu sırası ile 1,76 cm ile 1,25 µM, 1,53 cm ile 2,5 µM ve 1,26 cm ile 7,5 µM konsantrasyonlu ortamlar izlemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. NRM ortamında farklı BA konsantrasyonu varlığında eksplant başına meydana gelen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu.

4.3.Mikrosürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Ortama Aktarılması

In vitro da çoğaltımı sağlanan ve yaklaşık 2 cm boyuna gelen Mikrosürgünleri köklendirmek amacıyla 5, 6, 7. altkültürlerin sonunda köklendirme denemesine tabi tutulmuşlardır. Mikrosürgünlerde köklendirme ortamına aktarıldıktan yaklaşık bir ay sonra (4 hafta) köklenme meydana gelmiştir. IBA' nın bütün konsantrasyonlarında köklenme oranı % 15 in altında kalmıştır. Benzer şekilde kök gelişimi (uzaması) çok yavaş olmuştur. Köklenen mikrosürgünler tedrici olarak akklimatize edildikten sonra başarıyla dış ortama aktarılabilmektedir (Şekil 4.9).

Aktif kömürün köklenme üzerine etkisine bakıldığında aktif kömür köklenme bakımından azda olsa köklenme üzerine etkisi olmuştur. Ancak aktif kömür varlığında da köklenme oranı % 20'nin altında kalmıştır. Elde edilen köklenme sonuçları başarılı bir mikroçoğaltım programı için yetersiz kalmakta ve aynı zamanda *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin zor köklenen bir tür olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. Köklenme ortamında köklenen mikrosürgünler ve köklenen mikrosürgünlerin akklimatize edildikten sonra dış ortama aktarılması.

Elde edilen köklenme sonuçları başarılı bir mikroçoğaltım programı için yetersiz kalmakta ve aynı zamanda *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin zor köklenen bir tür olduğunu göstermektedir. Mikro çoğaltımda her ne kadar diğer aşamalarda başarı elde edilse de köklendirme aşamasında elde edilen başarının düşük olması köklenme üzerine yeni çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir. Benzer sonuçlar zor köklenen diğer bazı türler için de bildirilmiştir.

Özellikle zor köklenen türlerde farklı hormon ve ortam koşullarının iyileştirilmesinin yanında altkültür sayısının artırılması ile de iyi bir köklenmenin sağlanabileceği çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (Pınar, 2007). Örneğin Nas ve Read (2004b) zor köklenen Fındık mikrosürgünleri için uygun ortam belirlendikten sonra altkültür sayısını arttırarak mikrosürgünlerin %95'i üzerinde bir köklenme elde etmişlerdir. Aynı şekilde Hou ve ark. 2010 alt kültür sayısını arttırarak kestane mikro sürgünlerinde köklenme oranını 2 katına çıkarmışlardır. *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin mikrosürgünlerinde daha iyi bir köklenmenin sağlanması için farklı hormon ve konsantrasyonları ile denemelerin devam ettirilmesi gerekmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda kimyasalların muamelesi ve şok uygulamalarının etkisinin araştırılması önemli olacaktır.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Prunus arabica (Olivier) Meikle için *in vitro* mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada; kültürlerin sürdürülebilmesi için kültür ortamına sitokinin (BA) eklenmesinin gerekli olduğu görülmüştür. Sürgün kalitesi, sayısı ve uzunluğu dikkate alındığında en uygun Hormon konsantrasyonunun meta-Topolin konsantrasyonunun 7,5 µM olduğu görülmüştür.

Kültürlerin çoğaltılmasında kullanılan ortamlar içerisinde *Prunus arabica* (Olivier) Meikle için en uygun ortamın Nas ve Read (NRM) ortamı olduğu görülmüştür. Ayrıca, çoğaltma katsayısı ve sürgün uzunluğunun kültür ortamı ve sitokinin konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Prunus arabica* (Olivier) Meikle'nin mikroçoğaltımında karşılaşılan en ciddi problem mikro sürgünlerin sterilizasyon aşamasında temiz materyalin zor elde edilmesi ve köklenmenin yetersiz olması olarak belirlenmiştir. Yetersiz köklenme mikroçoğaltım protokolünün başarısını sınırladığından bu problemin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir. İyi bir köklenmenin sağlanabilmesi için zor köklenen türlerde ortam koşullarının iyileştirilmesi ve değişik şok uygulamasının yapılması, alt kültür sayısının arttırılması ve sıvı kültürün kullanılması etkili olabilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Laila, K.M.A (1995a). *Propagation of Amygdalus arabica Oliv. by stem cuttings and seeds [Prunus spartioidis-natural growth; Jordan]*, Lisansüstü Tezi, University of Jordan Faculty of Graduate Studies.
- Abu-Laila, K.M.A (1995b). *Propagation of Amygdalus Arabica Oliv. by Cuttings*. Thesis University of Jordan, Amman, Jordan.
- Ağlar, E., 2005. Pertek (Tunceli) Yöresi Bademlerinin (*Prunus amygladus* l.) Seleksiyonu Yoluyla Islahı Üzerinde Araştırmalar yüksek lisans tezi Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Van.
- Ainsley, P. J., Collins, G.G ve Sedgley, M (2001a), “*In vitro* Rooting of Almond (*Prunus dulcis* Mill.), *In vitro Cellular and Development Biolgy- Plant*, Vol. 6, No. 8, s. 778-785.
- Ainsley, P. J., Hammerschlag, F. A., Bertozzi, T., Collins, G. G. And SEDGLEY, M. 2001b. Regeneration of Almond from Immature Seed Cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 221-226.
- Al Junaidee, M. 1973. *Natural Forest Trees and Shups in the Arap World*. Ministry of Agriculture, Amman, Jordan.
- Alkan, G., Seferoğlu H., 2014a. Bazı Badem Çeşitlerinin Aydın Ekolojisindeki Fenolojik ve Morfolojik Özellikleri,1(2) : 38-44
- Alkan, G., Seferoğlu H., 2014b. Bazı Badem Çeşitlerinin Aydın Ekolojisindeki Fenolojik ve Morfolojik Özellikleri. 1(2) Sayfa/Page: 38-44 Araştırma Makalesi Research Article 2148-0036.
- Anonim, 2012. “Badem Yetiştiriciliği”. <http://www.cinarziraat.com/meyvecilik/87->
- Antonopoulou, C., Dımassı, K., Therios, I., Chatzıssavvıdıs, C., Tsırakoglou, V., 2005. Inhibitory Effects of Riboflavin (Vitamin B2) on the *In vitro* Rooting and Nutrient Concentration of Explants of Peach Rootstock GF 677 (*P. amygdalus* x *P. persica*).
- Aradhya M., Stover, E., 2006. Following Almond Footprints in California. Following Almond Footprints (*Amygdalus communis*, L.) Cultivation and Culture, Folk and History, Traditions and Uses. *Scripta Horticulturae*, 4, 161–165.

- Bhojwani S.S., Razdan M.K., 1996. Clonal Propagation, p. 483-536. In: S.S. Bhojwani and M.K. Razdan (eds.). Plant Tissue Culture: Theory and Practise, Rev. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Bürün, B., Türkoğlu, G., 1996. Meristem ve Sürgün Ucu Kùltürleri (1). Meristem ve Sürgün Ucu Kùltürü Uygulamaları Y.Y.Ü.Z.F. Dergisi 6 (3): 103-111.
- Channuntapıpat, C., Sedgley, M. And Collins, G., 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan x Nemaguard. Scienta Horticulturae, 98 (4) : 473- 484.
- Cluster, E., 1992. Improvement of In vitro Plant Cultures at Laboratory and Industrial Scales: Control of Gaseous Environment by Using Selective Membranes as Lids of Culture Containers. VI- Production and Storage. www.nf-2000.org/secure
- Cos, J., Frutos, D., Synchez, M.A., Rodriguez, J. And Carrillo, A., 2004. Determination of the Optimal Culture Medium and Growth Regular Concentration for the *In vitro* Poliferation Stage of the Peach- Almond Hybrid Mayor. ISHS Acta Horticulturae 658: I International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species. <http://www.ishs.org>
- Damiano, C., Monticelli, S. 1998. In vitro Fruit Trees Rooting by Agrobacterium rhizogenes Wild Type Infection. Electronic Journal of Biotechnology, 1 (3). www.ejbiotechnology.info/content/voll/issue
- Denisov, Vp., 1988. Almond genetic sources in the ussr and their use in production and Flowering. Acta Horticulturae 224:299-306.
- Fotopoulos, S., Sotiropoulos, T. E., 2005. *In vitro* Rooting of PR 204/84 Rootstock (*P. persica* x *P. amygdalus*) as Influenced by Mineral Concentration of the Culture Medium and Exposure to Darkness for a Period. Agronomy Research 3(1), 3-8.
- Gürel, S, Ve Gülşen, Y., 1998b. The Effects of Different Sucrose, Agar, and pH levels

- on *in vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. of Botany, 22:363-373.
- Gürel, S., Gülşen, Y., 1998a. The Effects of IBA and BAP on *In vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. of Botany, 22: 375-379.gaziantep yerel haber Erişim Tarihi: 15.09.2018.
- Kamalı, K., Majıdı, E. and ZARGHAMI, R., 1999. Micropropagation of GF- 677 Rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). Proceedings of the XI GREMPA Seminar, 1-4 September, 1999, Sanliurfa, (Turkey) Cahiers Options Mediterraneennes, Vol: 56,175-177.
- Kamalı, K., Majıdı, E. And Zarghamı, R., 2001. Micropropagation of GF- 677 Rootstocks (*P. amygdalus* x *P. persica*). 11. GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds CIHEAM-IAMZ. 56 (175-177)
- Kester, D. E., Asay, R., 1975. Almonds. in j. Janick and j.n. moore (eds). advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, Lafayette, Indiana, 387- 419.
- Khalil Ry, Al-Eisawi Dm. 2000A. Seed germination of *Amygdalus arabica* as influenced by stratification and certain plant bioregulators. Acta Hort. 517: 21-30.
- Khalil Ry, Al-Eisawi Dm. 2000B. Seed germination of *Amygdalus arabica* as influenced by stratification and certain plant bioregulators. Acta Hort. 517: 21-30.
- Küden A., Küden A.B., Bayezit S., Çömlekçioğlu S., İmrak B., Rehber Dikkaya Y., 2014. Şeftali, Nektarin, Badem ve Elma Çeşit Adaptasyonu Projesi. Proje No.: 5.2.3.1, TAGEP, Adana.
- Küden A., Küden A.B., Bayezit S., Çömlekçioğlu S., İmrak B., Rehber Dikkaya Y., 2014. Şeftali, Nektarin, Badem ve Elma Çeşit Adaptasyonu Projesi. Proje No.: 5.2.3.1, TAGEP, Adana.
- Madani B., Rahemi M., Assad Mt., Tafazoli E., Mardani AA. 2006. A study on morphological, cytogenetic and grafting take of five almond rootstocks. M.Sc. Thesis, University of Shiraz, Shiraz, p.92.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları, Mikro Çoğaltım. Selçuk Üni. Yay. 374 s. (262-281)

- Molassiotis, A. N., Dımassı, K., Diamantıdıs, G. And Therios, I., 2003. Fe- Eddha Promotes Rooting of Rootstock GF-677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) Explants *In vitro* Biologia Plantarum 47 (1): 141-144.
- Nas M.N., Read P.E., 2004. A Hypothesis for The Development of a Defined Tissue Culture Medium of Higher Plants and Micropropagation of Hazelnuts. *Sci. Hortic.* 101: 189-200.
- Nas M.N., P.E. Read. V. Miller, P.A. Rutter. 2003. *In vitro* Rejuvenation of Woody Species is Temporary. *Acta Hort.* 625:211-215
- Özbek, S., 1978. Özel meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:128, Ders Kitabı:11, Adana, 485s.
- Parlakcı H., (2008). Yabancı kökenli değişik badem çeşitlerinin bazı pomolojik ve kimyasal özellikleri ile bitki besin maddesi kapsamalarının belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi. Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Qrunfleh, M.M. 1993. Studies on the Hawthorn (*Crataegus azarolus* L.) III.A Potential Rootstock for "Golden Delicious" Apple and "Williams" Pear. *J. Hort. Sci.* 68:983- 987.
- Rodrigues, A.C., Silveira, C.A.P., Fortes, G.R. De L., FachineLLO, J.C. and SILVA, J.B., 2003. Establishment and Multiplication *In vitro* of *Prunus* sp. in Different Culture Media. *Rev. Bras. Frutic.* 25 (1) Jaboticabal abr. www.scielo.br
- Rugını, E., Monastra, F., 2003. Temperate fruits. In S.K. Mitra, D.S. Rathora And T.K. Bose (Eds).*Display Printers (P) Ltd., India, Isbn 81-900171-1-X, Volume I, P: 344- 414.*
- Sathyanarayana Bn, Varghese Db (2007). *Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols.* I. K. International. pp. 106.
- Soylu, A., 2003. Ilıman iklim meyveleri II. Uludağ Üniversitesi Zir. Fak. Ders Notları No:72, Bursa, s: 204-220
- Suttle G.R. L., 1996. Commercial Laboratory Production, p. 331-339. In: Tigiano RN, Gray DJ (eds.), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, New York

Wolella Ek (2017). Surface sterilization and in vitro propagation of *Prunus domestica* L. cv. Stanley using axillary buds as explants. Journal of Biotech Research, 8:18-26 yetişen bademlerin (*Prunus amygdalus l.*) seleksiyonu. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (doktora tezi, basılmamış), Van, 240s.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı.2011 yılında Kahraman Maraş Sütçü İman üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde yüksek öğrenimine başladı ve 2015 yılında mezun oldu.2015 yılında Şırnak Ünüversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

Şırnak, 2019

Makbule Gök