

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GF-677 HİBRİT (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) ANACININ İN VİTRO
REJENERASYONU ve MİKRO ÇOĞALTIMI**

Aslı Neslihan ÖZDEN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2007**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GF-677 HİBRİT (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) ANACININ İN VİTRO
REJENERASYONU ve MİKRO ÇOĞALTIMI**

Aslı Neslihan ÖZDEN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2007**

Prof. Dr. Bekir Erol AK danışmanlığında Aslı Neslihan Özden' in hazırladığı “GF-677 Hibrit (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) Anacının *in vitro* Rejenerasyonu ve Mikro Çoğaltımı” konulu bu çalışma 03 / 07 / 2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Bekir Erol AK

Üye : Prof. Dr. İbrahim BOLAT

Üye : Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS

Bu Tezin Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 718

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Bitki materyalinin (eksplant) yüzeysel sterilizasyonu.....	17
3.2.2. Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu.....	18
3.2.3. Kültür şartları.....	18
3.2.4. Boğum eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması.....	18
3.2.5. Sürgün rejenerasyonu için yaprak eksplantlarının kültüre alınması.....	19
3.2.6. Kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu.....	20
3.2.7. Mikro sürgünlerin boylarının uzatılması.....	20
3.2.8. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi.....	21
3.2.9. Dış koşullara alıştırma (aklimatizasyon).....	21
3.2.10. İstatistiksel değerlendirme.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. Bitki Materyalinin Yüzeysel Sterilizasyonu.....	22
4.2. Boğum Eksplantlarından Sürgün Gelişimi ve Kardeşlenme.....	25
4.3. Yaprak Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu.....	28
4.4. Kallus Dokusundan Sürgün Rejenerasyonu.....	32
4.5. Kallustan Elde Edilen Mikro sürgünlerin Boylarının Uzatılması.....	34
4.6. Mikro Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	35
4.7. Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması.....	37
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	46
ÖZET.....	47
SUMMARY.....	49

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

GF-677 HİBRİT (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) ANACININ İN VİTRO REJENERASYONU ve MİKRO ÇOĞALTIMI

Ash Neslihan ÖZDEN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bekir Erol AK
Yıl: 2007, Sayfa: 50

Bu çalışmada, bademe anaç olarak kullanılan GF-677 hibrit (*P. amygdalus* x *P. persica*) anacının *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturulmuştur. Boğum eksplantları farklı konsantrasyonlarda (0.5-2.0 mg/l) BA (benziladenin) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. 1 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantlarında yüksek oranda sürgün oluşumu ve kardeşlenme sağlanmıştır. *In vitro* sürgünlerin genç yaprakları alınarak, farklı konsantrasyonlarda TDZ (thidiazuron) veya BA içeren MS ya da TDZ ve BA'nın NAA (naftalen asetik asid) ile farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Yaprak eksplantları üç hafta karanlık periyottan sonra 16 saat fotoperiyoda tabii tutulmuştur. Üç haftalık karanlık uygulaması süresince yaprak eksplantlarının kesik yüzeylerinde kallus oluşumu başlamıştır. Yaprak eksplantları üç hafta aralıklarla taze besin ortamında altkültüre alınmıştır. 1 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınan *in vitro* sürgünlerin dip kısımlarında beyaz renkli yoğun bir kallus oluşumu başlamıştır. Sürgün diplerindeki kallus dokularından rejenera olan adventif sürgünler boylarının uzatılması amacıyla 0.0, 0.1 veya 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün boyunun uzaması için en etkili kültür ortamının 0.5 mg/l BA, 30 g/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamı olduğu belirlenmiştir. Boyları uzayan sürgünler köklendirilmek amacıyla 0.05-2.0 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 1 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında %84.2 oranında köklenme elde edilirken, köklü bitkiciklerin %66.4'ü dış koşullara alıştırılabilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: GF-677, anaç, rejenerasyon, *in vitro*, BA

ABSTRACT

MSc Thesis

IN VITRO REGENERATION and MICROPROPAGATION of GF-677 HYBRID (*Prunus amygdalus* X *P. persica*) ROOTSTOCK

Aslı Neslihan ÖZDEN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Bekir Erol AK
Year: 2007, Page: 50

In this research a complete regeneration protocol was developed for GF-677, an important rootstock for almond. Nodal sections were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with various concentrations (0.5-2.0 mg/l) of BA (benzyladenin). The highest rate of adventitious shoot initiation and multiplication was recorded at concentration of 1 mg/l BA. The young expanding leaves were excised from *in vitro* shoots and cultured on MS medium supplemented with TDZ (thidiazuron) or BA alone, or in combination with NAA (naphthalene acetic acid) for 3 weeks in the dark and then transferred to a 16/8 hour of (light/dark) photoperiod. Callus formation occurred on the leaf explants within 3 weeks in the dark. The explants were subcultured the same medium at 3-week intervals. After 4 subcultures any regeneration had been observed on the leaf explants. Callus formed at the bases of shoots on MS medium supplemented with 1 mg/l BA and the adventitious shoots differentiated from these calli. Regenerated shoots from callus were scored, excised, and transferred to elongation medium supplemented with 0.0, 0.1, or 0.5 mg/l BA. MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, and 5.5 g/l agar provided the best shoot elongation. Elongated shoots of GF-677 were cultured on ½ MS medium supplemented with 0.05-2.0 mg/l IBA for rooting. On ½ MS medium containing 1.0 mg/l IBA, a maximum rooting efficiency of up to 84.2% was obtained. Rooted plantlets were successfully acclimatized and transferred to potting mix with 66.4% survival.

KEY WORDS: GF-677, rootstock, regeneration, *in vitro*, BA

TEŞEKKÜR

“GF-677 Hibrit (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) Anacının *in vitro* Rejenerasyonu ve Mikro Çoğaltımı” adlı çalışmamda bana araştırma imkanı veren ve her aşamada desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Bekir Erol Ak’a teşekkür ederim. Çalışmam boyunca daima yanımda olan, bana olan güvenini her fırsatta göstererek beni sürekli yüreklendiren ve en önemlisi doku kültürü hakkında bilmem gereken her şeyi öğreten, uyarı ve eleştirileriyle bana yön vererek, bu konudaki yoğun bilgi ve tecrübesiyle bana danışmanlık yapan, böylesine güzel bir alanda uzmanlaşma fırsatını yakalamama yardımcı olan eşim Yrd. Doç. Dr. Mustafa Özden’e sonsuz kere teşekkür ederim. Yine çalışmam süresince gerek maddi gerek manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem, Bedriye Kaymaz, ve babam, Mustafa Kaymaz’a teşekkürü bir borç biliyorum. Yüksek lisans öğrenimim süresince benimle birlikte her türlü sıkıntıya katlanarak, bana manevi yönden itici bir güç olan sevgili oğullarım Onur ve Özgür Özden’e de teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yürüttüğüm Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarı’nın kurulmasında büyük katkıları bulunan Sayın Prof. Dr. M. Atilla Gür’e, yine laboratuvarın kuruluş aşamasında katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Ali Çullu’ya teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Tez çalışma ortamımın oluşturulmasında çok büyük emekleri olan Yrd. Doç. Dr. Mustafa Özden’ e, Yrd. Doç. Dr. Murat Dikilitaş’a, Arş. Gör. Ufuk Demirel ve Arş. Gör. Mehmet Karakuş’a teşekkür ederim.

Çalışmamın projelendirilmesi aşamasında öneri ve uyarıları ile bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Nuray Çömlekçioğlu’na teşekkür ederim. Araştırmamda kullandığım bitkisel materyalin temininde yardımcı olan Frutaş Fidancılığa da teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Farklı NaOCl konsantrasyonlarının bitkisel materyal yüzey sterilizasyonundaki etkinliği.....	23
Çizelge 4.2. Boğum eksplantlarından sürgün gelişimi.....	25
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan BA'nın boğum eksplantlarından elde edilen kardeşlenme sayısı.....	26
Çizelge 4.4. Bitki büyüme düzenleyicilerinin GF-677'nin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	29
Çizelge 4.5. GF-677 hibrit anacımın kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu.....	34
Çizelge 4.6. BA konsantrasyonlarının mikro sürgün boyuna etkisi.....	34
Çizelge 4.7. <i>In vitro</i> sürgünlerin köklendirilmesi.....	35
Çizelge 4.8. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması.....	37
Çizelge 5.1. Denemenin aşamaları.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. A; Başlangıç kültür ortamı içeren petri kutusu, B; başlangıç kültür ortamı içeren kültür kabı.....	19
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda NaOCl solüsyonu içinde yüzeysel sterilizasyonu yapılan eksplantların gelişme durumu. A; kültüre alınan boğum eksplantlarının kültür başlangıcı, B; sağlıklı sürmüş boğum eksplantları, C; kontamine olmuş boğum eksplantları, D; yüzey sterilizasyonu aşamasında canlılığını kaybetmiş boğum eksplantları.....	23
Şekil 4.2. 2.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantlarından gelişen camlaşmış <i>in vitro</i> sürgün.....	26
Şekil 4.3. 0.1 mg/l BA, 30 gr/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamında kültüre alınan ve orta damar boyunca kıvrılan yaprak eksplantlarının kültür başlangıcından 10 gün sonraki görünümü.....	28
Şekil 4.4. A; 0.4 mg/l BA, B; 0.2 TDZ + 0.1 NAA, C; 0.1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren, D; 0.1 mg/l BA içeren kültür ortamında kültüre alınan yarak eksplantları.....	30
Şekil 4.5. <i>In vitro</i> sürgünlerin dip kısmında oluşan beyaz renkli, yoğun, 3 haftalık kallus dokusu.....	32
Şekil 4.6. A ve B; <i>in vitro</i> sürgünlerin dip kısmında oluşan kallus dokusunun sürgünden ayrılarak kültüre alınması sonucunda test tüplerinde fenolik madde birikimi, C; sürgün dibinden ayrılmadan kültüre alınan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu. 3 haftalık kalluslar ve 5 haftalık <i>in vitro</i> sürgünler.....	33
Şekil 4.7. <i>In vitro</i> sürgünlerin dip kısmında oluşan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu, 2. altkültür aşamasındaki <i>in vitro</i> sürgün yaklaşık 6 haftalık.....	33
Şekil 4.8. A; 1mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında köklendirilen <i>in vitro</i> sürgün, B; dış koşullara alıştırmış <i>in vitro</i> GF-677 bitkisi. 3 haftalık bitki (sol), 8 haftalık bitki (sağ).....	37
Şekil 4.9. Torf:perlit (1:1) içeren ortama transfer edilerek iklim odasında büyütülen 12 haftalık bitkicikler.....	38

SİMGELER DİZİNİ

2-ip	6(γ,γ - Dimethyl allyl amino) purine
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic asid
AP	Almehdi ve Parfitt besin ortamı
Atm	Atmosfer
BA	Benziladenin
BAP	6-Benzil aminopurin
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
CH	Kazein hidrolizat
DKW	Driver ve Kuniyuki besin ortamı
dk	Dakika
GA ₃	Giberellik asid
HCl	Hidroklorik asid
HgCl ₂	Civa klorür
IBA	İndol butirik asid
Kn	Kinetin
LS	Linsmaier ve Skoog besin ortamı
mM	Milimol
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
MSMO	Murashige ve Skoog Minimum Organik besin ortamı
NAA	Naftalen asetik asid
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
PG	Floroglusinol
PVP	Polivinilpyrolidon
QL	Quorin ve Lepoivre besin ortamı
TDZ	Thidiazuron
WPM	Lloyd ve McCown besin ortamı

1. GİRİŞ

Meyve türlerinin çoğunluğu yabancı tozlandıklarından yeni generasyonlarındaki açılım nedeniyle, klonal çoğaltım için vegetatif olarak aşı ile çoğaltılırlar. Aşı uygulamaları anaç kullanmayı gerektirmektedir. Meyve yetiştiriciliğinde çöğür (generatif) ve klon (vegetatif) anaçlar kullanılmaktadır. Klon anaçlar çöğür anaçlara göre üstün özelliklere sahiptir. Klon anaçlar aynı kalıtsal yapıya sahip oldukları için birörnek bireyler meydana getirirler. Bu anaçlar üzerine aşılı çeşitlere ait ağaçların büyüme kuvvetleri, soğuğa, kurağa, hastalık ve zararlılara karşı dayanımları aynıdır. Yetiştirilecek çeşitlere uygun klon anaçlar seçildiği takdirde ağaçların verime daha erken yatması sağlanabilir ayrıca meyve verim ve kalitesi artırılabilir. Anaçların bodurlaştırıcı etkisi sayesinde kültürel işlemler daha kolay yapılabilir (Ağaoğlu ve ark., 1995).

Badem x şeftali melezi olan GF-677, 1940'lı yılların ortalarında Fransa'da keşfedilmiştir, son yıllarda şeftali ve bademe anaç olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi için badem anacı olarak ön plana çıkmaktadır. Sulanabilir taban arazilerde kapama badem bahçeleri oluşturmak için son derece uygun bir anaçtır. Çöğür anaçlara nazaran daha büyük taç yapar, kuvvetli büyür. Ağır, orta ve hafif bünyeli topraklara adaptasyonu iyidir. % 12-13 kireç ihtiva eden topraklarda dahi yetiştirilebilir. Bu topraklarda görülen kloroza dayanıklılığı fazladır. Kuru, kireçli ve bilhassa yamaç araziler için uygun bir anaçtır. Bu anaca aşılı çeşitler kısa zamanda verime yatar. *Verticillum*, *Phythora* vb. toprak kökenli hastalıklara dayanımı iyidir. GF-677 anacının çoğaltılmasında en uygun yöntem yeşil çelik ve bitki doku kültürleridir (Rom ve Carlson, 1987; Gür, 2003).

Gönülşen (1987) doku kültürlerini, diğer vegetatif üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan eksplantların sterilize edildikten sonra steril, yapay besin ortamında kültüre alınması olarak tanımlamıştır. Doku kültürleri ile mikro çoğaltımın çelikle çoğaltmaya göre bir çok üstün özelliği vardır.

Bu özelliklerin en önemlileri; doku kültürü ile çoğaltımda çok kısa sürede gereksinim duyulan miktarda anaç elde etme olanağı vardır. Üstün genetik özelliklere sahip fakat virüs ile bulaşık materyalden virüsten arı anaç elde edilmesi mümkündür. Doku kültürü teknikleri mikro çoğaltım dışında ıslah çalışmalarında da uygulama alanı bulmaktadır. Embriyo kurtarma tekniği, haploid bitki eldesi, somatik melezleme, germplazm muhafazası, gen transferi gibi yöntemler doku kültürünün bitki ıslahındaki uygulamalarına örnek olarak verilebilir (Babaoğlu ve ark., 2002). Ayrıca çeşitli bitkisel metabolitlerin elde edilmesi ve bitki materyalinin uzun süreli muhafaza edilmesine de olanak sağlar (Gönülşen, 1987).

Birçok odunsu meyve türünün genetik olarak geliştirilebilmesi için gerekli olan öncelikli koşul, ilgili meyve tür veya çeşidinin rejenerasyon sisteminin tamamlanmış olmasıdır (Litz ve Gray, 1992). Günümüze kadar bademde olduğu gibi birçok odunsu meyve tür ve çeşidinin rejenerasyon sistemi üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Miguel ve ark., 1996). Ancak bu araştırmada kullanılacak olan GF-677 melez anacının *in vitro* rejenerasyonu üzerinde yeterli çalışmanın yapılmamış olması, bu anacın genetik olarak üstün özellikler taşıması ve genel olarak ülkemizin iklim ve toprak koşullarına uygun bir anaç olması çalışmanın önemini bir kez daha artırmaktadır.

Yürütülen bu araştırmada, ülkemiz genelinde ve özellikle kireçli Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin topraklarına iyi adapte olmuş GF-677 hibrit anacının *in vitro* koşullarda yaprak ve kallus eksplantlarının rejenerasyon kapasiteleri araştırılmış, farklı eksplantlardan adventif sürgün elde edilmesi üzerine değişik bitki büyüme düzenleyicilerinin ve konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Böylece GF-677 hibrit anacının *in vitro* rejenerasyonu için etkin bir protokol geliştirilmiştir. Özellikle GF-677 hibrit anacının genetik transformasyonu için gerekli olan ilk aşama sonuçlandırılarak bu anaçla ilgili olarak gelecekte yapılacak biyoteknolojik araştırmalar için referans olarak başvurulabilecek bilimsel bir çalışma yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Escalettes ve Dosba (1993), yaptıkları çalışmada *Prunus* türlerinden yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. *Prunus* türlerinin *in vitro* rejenerasyon uygulamalarına gösterdikleri tepkiler farklı olmuştur. 'H.152' kayısı klonuna yapılan uygulamada Quoirin (Quorin ve ark., 1977) makro elementleri kullanılmış, ayrıca 'H.146' kayısı ve 'P.1869' hibrit erik klonunun rejenerasyon çalışmasında ½ MS (Murashige ve Skoog, 1962) kültür ortamı kullanılması rejenerasyonu teşvik etmiştir. Adventif sürgün oluşumuna en etkili faktör TDZ (thidiazuron)'nin tek başına veya naftalen asetik asit (NAA) ile kombinasyonları ile yapılan uygulamalar olmuş, optimum konsantrasyonlar genotipe bağlı olarak değişmiştir. Besin ortamına gümüş nitrat (AgNO₃) eklenmesi rejenerasyonu %10-40 oranında artırmıştır. Yine besin ortamına AgNO₃ eklenmesiyle, *P. Marianna*, *P. domestica* ve *P. insititia* türlerine ait erik klonlarının da rejenerasyonu sağlanmıştır.

Rugini ve ark. (1993), köklenmesi güç olan meyve türlerinin (badem, elma, kayısı, kestane, çin armut anacı, jojoba, zeytin, armut ve ceviz) mikro sürgünlerine *in vitro* koşullarda putresin uygulamasının ve köklenme ortamının karartılmasının köklenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Putresin, besin ortamına sürgün çoğaltımı aşamasında ve köklendirme süresince eklenmiştir. Sürgün çoğaltımı sırasında her tür için kullanılan besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı farklı olmuştur. Çalışmada Ferraduel badem çeşidi kullanılmıştır. Badem sürgünlerinin çoğaltılması aşamasında 3.5 µM benzil adenin (BA) ve 0.08 µM NAA ile desteklenen DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) besin ortamı kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan tüm türler için köklendirme ortamı olarak 5 µM NAA içeren ½ Bourgin ve Nitsch (Bourgin ve Nitsch, 1967) besin ortamı kullanılmıştır. Oksin içermeyen köklenme ortamına putresin eklense dahi sürgünlerde kök oluşmamıştır. Köklendirme ortamına 1 mM putresin ilave edilmesi elma ve zeytinde köklenmeyi artırırken; cevizde köklenme oranını azaltmış; armut, badem, jojoba ve kayısıda

köklenme oranını etkilememiştir. Badem, ceviz ve kestane sürgünlerinin köklenmesi için, besin ortamının karartılması gerektiği belirtilmiştir.

Gürel ve Gülşen (1998a), Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis* L.) çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* vejetatif çoğaltma olanaklarını araştırmışlardır. İlk dikim, şaşırtma ve çoğaltma aşamalarında farklı konsantrasyonlarda (0.0-0.5 mg/l) indol-3-bütirik asit (IBA) ve (0.0-3.0 mg/l) 6-benzil amino pürin (BAP)'in etkileri araştırılmıştır. Hormon içermeyen veya düşük düzeyde IBA (0.1 mg/l) içeren besin ortamlarında kültüre alınan esplantların boyu daha çok uzamıştır. BAP'in sürgün oluşumu için mutlak gerekli olduğu ortaya konmuştur ancak yüksek konsantrasyonlar (2-3 mg/l) sürgünlerin canlılığının azalmasına ve camlaşmaya (hiperhidrisity) sebep olmuştur. Araştırmada kullanılan iki çeşidin sürgün gelişiminin 1.0 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA içeren MS besin ortamında en iyi olduğu belirtilmiştir.

Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis* L.) çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* vejetatif çoğaltma olanakları Gürel ve Gülşen (1998b), tarafından araştırılmıştır. Bu amaçla ilk dikim, şaşırtma ve çoğaltma aşamalarında farklı sukroz, agar ve pH düzeylerinin sürgün kardeşlenmesi, sürgün gelişmesi ve büyümesi üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda genel olarak çoğaltmanın değişik aşamalarında % 5-6 sukroz, % 0.7 agar ve 5.5 pH'in en uygun düzeyler olduğu belirlenmiş olup, yüksek sukroz ve agar dozlarının sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumunu artırdığı gözlenmiştir.

Hammatt ve Grant (1998)'in yaptığı çalışmada, *P. serotina* ('Seedling A', 'PBS', '2322', '2339', 'Pavia E'), *P. avium* ('F12/1', 'Charger', '1908') ve *P. avium* x *P. sargentii* ('Hybrid 1', 'Hybrid 2') hibrit türlerinin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkili faktörler araştırılmıştır. Çalışmada WPM (Lloyd ve McCown, 1981), DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984), MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besin ortamları, bitki büyüme düzenleyicilerden BA, TDZ, NAA, IBA (indolbutirik asit) ve GA₃ (giberellik asit)'ün farklı konsantrasyonları ile desteklenmiştir. *P. serotina*'ya ait genotiplerin, WPM besin ortamında DKW besin

ortamına nazaran daha rejeneratif oldukları gözlenmiştir. *P. serotina*'nın yaprak eksplantlarında, genotiplere göre farklılık göstermekle birlikte %8-78 oranında rejenerasyon elde edilmiştir. TDZ (4.4 µM) ve 0.54 µM NAA içeren WPM besin ortamında 2322 çeşidinin yaprak eksplantlarından %78 sürgün rejenerasyonu elde edilirken, 2339 çeşidinin yaprak eksplantlarından %8 sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Besin ortamına eklenen TDZ'nin rejenerasyon oranına etkisinin BA'ya göre daha olumlu olduğu tespit edilmiştir. Araştırma, *P. serotina* yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde edilen ilk çalışmadır.

Kamali ve ark. (1999) tarafından GF-677 (*Prunus amygdalus x P. persica*) hibrit anacının mikro çoğaltımı üzerine bir araştırma yürütülmüştür. Bu amaçla Nisan ayında hibrit anacın apical ve lateral tomurcukları taşıyan sürgünleri alınıp, 6 dakika, % 0.1'lik civa klorür (HgCl₂) içerisinde sterilize edildikten sonra, lateral ve apical tomurcuklar MS, Knob (Knob, 1865) ve LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) temel besin ortamları üzerine transfer edilmişlerdir. Bu ortamlara çeşitli konsantrasyonlarda NAA (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l) ve BA (0.0, 0.1, 0.4, 0.7, 1.0, 2.0 mg/l) eklenerek sürgün çoğaltımı ve köklendirme için en uygun hormon kombinasyonu belirlenmiştir. Sürgün çoğaltımı için en uygun ortam Knob besin ortamına 1 mg/l BA ilave edildiğinde elde edilmiştir. Köklenme için en uygun ortam LS besin ortamına 0.3 mg/l NAA ve 1.6 mg/l thiamin eklenerek bulunmuş ve en iyi köklenme kültüre alınan eksplantların 7 gün karanlıkta tutulduğu ortamda elde edilmiş.

Muna ve ark. (1999)'nın yaptığı çalışmada 'Maxma-14' kiraz anacının *in vitro* çoğaltımı için etkili bir protokol ortaya konmaya çalışılmıştır. Eksplant kaynağı olarak 7-8 yaşlı ağaçların sürgün uçları ve aksillar tomurcuklarının kullanıldığı çalışmada, bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu civa klorür (HgCl₂) ile yapılmıştır. Sürgün çoğaltımına etkilerinin araştırılması amacıyla MS besin ortamına 2 sitokin (BA veya kinetin), 3 oksin (IBA, NAA veya indol-3-asetik asit (IAA)) ile farklı konsantrasyon ve kombinasyonları eklenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre 4.44 µM BA ve 0.49 µM IBA içeren MS besin ortamının sürgün çoğaltmak amacıyla en uygun ortam olduğu belirtilmiştir. Sürgünleri köklendirmek amacıyla besin ortamına 0.5 veya 2.45 µM NAA veya IBA içeren MS yada ½ MS kullanılmıştır.

2.45 µM IBA içeren MS besin ortamında en yüksek köklenme oranı (%95) elde edilmiştir. Köklendirme ortamına kinetin ilavesinin kök ve sürgün uzunluğunu arttırdığı belirlenmiştir. Kökler oluşuktan sonra sürgünlerin kısa süre içinde saksılara aktarılması, dış koşullara alıştırmada kolaylık sağlamıştır. Sıvı köklendirme ortamında köklendirilen sürgünlerin kök gelişimi daha iyi olduğundan bitkiciklerin canlılık oranı yüksek olmuştur.

Ainsley ve ark. (2000), Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitlerinden alınan yaprak eksplantlarından rejenerasyon sağlamak için bir metod geliştirmişlerdir. Araştırmada kullanılan eksplantlar, *in vitro* sürgünlerden alınmıştır. AP (Almehdi ve Parfitt, 1986) besin ortamına ilave edilen 3 farklı oksin (2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), NAA, IBA), 2 farklı sitokin (BA, TDZ) ve kazain hidrolizat (CH) kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Eksplantların uygulamalara olan tepkisi genotipe göre değişmiş olup, test edilen 3 adet oksinden NAA ve IBA, 'Ne Plus Ultra' yaprak eksplantlarında adventif sürgün oluşumunu teşvik etmiştir. 'Nonpareil' çeşidinde ise sadece IBA etkili olmuştur. Temel besin ortamında CH olmadığı durumda, TDZ yalnız başına Nonpareil çeşidinin yaprak eksplantlarından sürgün gelişimine etkili olduğu halde, 'Ne Plus Ultra' çeşidinin yaprak eksplantlarından sürgün gelişimi için ortama BA eklenmesi gerekmiştir. Kültür ortamına % 0.1 (w/v) CH eklenmesi her iki çeşitte de kallus oluşumunu teşvik etmiş ve sürgün rejenerasyonunu arttırmıştır. AP besin ortamına 0.1 (% w/v) CH, 9.8 µM IBA ve 22.7 µM TDZ ilave edildiğinde Ne Plus Ultra çeşidinde rejenerasyon oranı % 44.4 olmuştur. Yine AP besin ortamına 0.1 (% w/v) CH, 9.8 µM IBA ve (4.5, 6.8 veya 9.1 µM) TDZ ilave edildiğinde 'Nonpareil' çeşidinde maksimum rejenerasyon oranı %5.5 olmuştur.

Jain ve Babbar (2000), Knob's besin ortamında çimlendirilen *Syzygium cuminii* Skeels tohumlarından elde edilen 7-8 cm boyundaki bitkiciklerin epikotillerindeki boğumlardan sürgün çoğaltımı üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla MS besin ortamına, farklı konsantrasyonlarda BA, kinetin (Kn), izopentil adenin (2-ip), indol-3-asetik asit (IAA), NAA veya 2,4-D (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l) bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Kn ve 2-ip'in değişik konsantrasyonları sürgün

gelişimini bir miktar uyarsa dahi sürgün uzamasını engellemiştir. Sürgün çoğaltımına etkilerinin araştırılması amacıyla ortama eklenen oksinler (2,4-D, IAA, NAA) eksplantlarda sürgün oluşumu yerine köklenmeyi uyarmıştır. Sürgün oluşumu ve elde edilen sürgünlerin uzamasının sağlanması için en uygun kültür ortamı 1 mg/l BA içeren MS besin ortamı olarak tespit edilmiştir. 1.0 mg/l IAA içeren Knob's besin ortamına aktarılan sürgünlerin %100'ünde köklenme sağlanmıştır. Köklenen bitkiciklerin %76'sının dış koşullara alıştırılması başarı ile tamamlanmıştır.

Perez-Tornero ve ark. (2000)'nin Helena kayısı çeşidinde yürüttükleri çalışmada 4.4-22.0 μM BAP'ın 0.5-2.7 μM NAA ile, 2.3-13.5 μM TDZ'nin 0.5-5.4 μM NAA ile kombinasyonlarının yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkileri araştırılmıştır. Ayrıca yaprağın yaşı, besin ortamına yerleştirilme şekli, kültürün başlangıcında uygulanan karanlık periyodun süresi, kültür esnasındaki ışık yoğunluğu, jel yapıcı maddeler gibi faktörlerin sürgün rejenerasyon oranına etkileri üzerinde durulmuştur. Genç yaprakların eksplant olarak kullanıldığı kültürlerde, yaprağın alt yüzünün besin ortamına temas edecek şekilde kültüre alınması rejenerasyon oranını yükseltmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı (%24.3) 9.0 μM TDZ ve 2.7 μM NAA içeren QL (Quoirin ve Lepoivre, 1977) besin ortamında elde edilmiştir. Besin ortamının agar ile katılaştırılması, kültürün başlangıcında eksplantların 2-3 hafta karanlıkta kültüre alınması sürgün rejenerasyonunu teşvik etmiştir. Kültür esnasındaki ışık yoğunluğu sürgün rejenerasyon oranını etkilememiş fakat eksplantlardan fenolik madde salgısını etkilemiştir.

Ainsley ve ark. (2001a)'nin yapmış oldukları çalışmada, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Carmel ve Parkinson çeşitlerinin olgunlaşmamış meyvelerinin kotiledonlarından rejenerasyon yolları araştırılmıştır. Bu amaçla doğal yolla tozlanan ağaçlardan, çiçeklenmeden 100-115 gün sonra küçük meyveler toplanmıştır. Kotiledonların embriyoya yakın olan ucu kesilmiştir. Ayrıca embriyoya ait olan dokuların hepsi kesilip atılmıştır. Çalışmada TDZ'nin ve IBA'nın farklı konsantrasyonları ve kültürün ilk 7 gün karanlıkta tutulmasının rejenerasyona olan etkileri araştırılmıştır. Sürgün rejenerasyonu, eksplantların 8 hafta boyunca, 10.0 μM TDZ içeren MS besin ortamında tutulup daha sonra bitki büyüme düzenleyici (BDD)

maddeleri içermeyen ortama transfer edilerek burada 4 hafta tutulması sonucunda yüksek olmuştur. Kotiledonlardan alınan eksplantların 7 gün karanlıkta kültüre alınmaları rejenerasyonu teşvik etmiştir. Besin ortamına 0.5 µM IBA ilave edilmesi adventif sürgün gelişimini azaltmıştır. Belirlenen optimum kültür şartlarında ‘Ne Plus Ultra’, ‘Nonpareil’, ‘Carmel’ ve ‘Parkinson’ çeşitlerinden elde edilen adventif sürgün rejenerasyonu sırasıyla %80.0, %73.3, %100.0, %86.7 olmuştur.

Ainsley ve ark. (2001b)’nın yürüttüğü çalışmada Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitlerine ait mikro sürgünlerin *in vitro* şartlarda köklendirilmesi ile ilgili etkili bir protokol elde edilmeye çalışılmıştır. Köklendirme ortamının karartılmasının, besin ortamına PG (phloroglucinol) eklenmesinin, ayrıca IBA ve NAA’nın farklı konsantrasyonlarının köklendirmeye olan etkisi araştırılmıştır. Mikro çoğaltılan sürgünlerden Ne Plus Ultra çeşidine ait olanlar BBD içermeyen MS besin ortamında, Nonpareil çeşidine ait olanlar ise BBD içermeyen AP (Almehdi and Parfitt, 1986) besin ortamında 4⁰C’de, düşük ışık yoğunluğunda, 4 hafta kültüre alınmıştır. 4 hafta sonunda sürgünler köklendirme amacıyla IBA ve NAA (0, 2.5, 5.0 veya 10.0 µM)’nın farklı konsantrasyonlarını içeren ½ MS besin ortamına aktarılmıştır. Mikro sürgünler, 1.0 µM IBA içeren su-agar (% 0.6 w/v) içerisinde 12 saat bekletildikten sonra, oksin içermeyen fakat 100.0 µM PG içeren ortamda 2 hafta kültüre alınması köklenmeyi teşvik etmiştir. Ne Plus Ultra çeşidinin sürgünlerinin köklendirilmesinde ½ MS besin ortamı, Nonpareil çeşidinin sürgünlerinin köklendirilmesinde AP besin ortamı daha etkili olmuştur. Her ikisi için de köklenme oranı %60 olarak belirlenmiştir.

Gentile ve ark. (2002)’nin P16C15, Babygold 6, 842 Standard, San Giorgio ve Yumyeong şeftali çeşitleri üzerinde yürütmüş oldukları çalışmada, yaprak eksplantlarından adventif sürgün oluşturma olanakları araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan çeşitlere ait sürgün uçları BA ve NAA içeren, MS mikro elementleri ve LP (Quorin ve Lepoivre, 1977) makro elementlerinden oluşturulan besin ortamında 21 gün karanlıkta tutulduktan sonra oksin içermeyen besin ortamına aktarılmıştır. Üç haftalık bitkiciklerin üstten 4 yaprağı alınarak ana damara dik kesikler yapılmış ve üst yüzü besin ortamına temas edecek şekilde kültüre alınmıştır. Yaprak

eksplantlarına da 21 gün karanlık uygulaması yapılmış ve bu süre içinde eksplantlar üzerinde kallus oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra yaprak eksplantları oksin içermeyen besin ortamına transfer edilip, aydınlık koşullarda tutulunca kallus üzerinde adventif sürgün oluşumu gözlenmiş ve kallusların birkaç ay sürgün oluşturma yeteneğini koruduğu belirtilmiştir. P16C15, Babygold 6, 842 Standard, San Giorgio ve Yumyeong çeşitlerindeki rejenerasyon oranı sırasıyla %17, %13, %13, %17 ve %23 olmuştur.

Tang ve ark. (2002)'nin, yaptığı çalışmada *Prunus avium* L. ('Burlat', 'Hedelfinger', 'Napoleon' ve 'Schneiders') ve *P. cerasus* L. ('Beutal Spacher Rexelle' ve 'Morellenfeuer') türlerine ait toplam 6 çeşidin yaprak eksplantları rejenerasyon için kullanılmıştır. Rejenerasyon elde etmek amacıyla 1-2 mg/l BAP veya TDZ, 0.5-1.0 mg/l NAA veya IBA içeren, MS, DKW, QL (Quoirin ve Lepoivre, 1977) ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. Üzerinde kesikler yapıldıktan sonra alt yüzü besin ortamına değecek şekilde petrilere yerleştirilen yaprak eksplantlarında 14 gün içinde rejenerasyonun başladığı gözlenmiştir. BAP (2 mg/l) ve 0.5-1.0 mg/l NAA içeren WPM besin ortamında 'Early Burlat' dışındaki tüm çeşitlerde rejenerasyon elde edilmiştir. Çalışmada BAP'ın TDZ'ye oranla rejenerasyonu daha çok teşvik ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmanın, *P. cerasus* türünün yaprak eksplantlarından rejenerasyon sağlanan ilk çalışma olduğu belirtilmiştir.

Channuntapipat ve ark. (2003)'nin yaptıkları çalışmanın sonucunda, Nonpareil 15-1 ve Ne Plus Ultra çeşitleri ile mikro aşılınmış badem x şeftali hibrit anaçları elde edilmiştir. Öncelikle her genotipin sürgün uçlarından alınan eksplantlarla *in vitro* sürgün çoğaltımı sağlanmıştır. En uygun sürgün çoğaltma ortamı her genotip için farklı bulunmuştur. 'Nonpareil' için 0.049 µM IBA, 3 µM BAP içeren AP, 'Ne Plus Ultra' için 0.049 µM IBA, 5 µM BAP içeren MS, hibrit anaç için 10 µM BAP içeren MS besin ortamı en uygun sürgün çoğaltma ortamları olarak tespit edilmiştir. Anaçtan elde edilen 20 mm boyundaki sürgünler 2.4 µM IBA içeren ½ MS köklendirme ortamına aktarıldığında sürgünlerin % 88'i köklenmiştir. Çeşitlerden elde edilen sürgünler 15 mm uzunluğa eriştiklerinde *in vitro* anaçlar üzerine

mikroaşılama yapılmıştır. Aşılı bitkiciklerin canlılık oranının %92 olduğu belirtilmiştir.

Jain ve Babbar (2003)'ın *Syzygium cuminii* Skeels erik çeşidi ile yürüttüğü çalışmada, 30 yaşlı ağaçların yıllık sürgünlerinden alınan boğum eksplantları kullanılarak sürgün gelişimi üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmıştır. Doku kültürü uygulamalarında rutin olarak kullanılan sterilizasyon işlemlerine ek olarak bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonu sırasında %0.2 (w/v) bavistin (fungusit) ve bakteriyel bulaşıklığı önlemek amacıyla %0.02 (w/v) ampicillin uygulanmıştır. Ayrıca eksplant kararması sorununun giderilmesine yönelik olarak antioksidantlar ile farklı uygulamalar yapılmıştır. Sürgün gelişimini sağlamak amacıyla MS temel besin ortamına değişik konsantrasyon ve kombinasyonlarda BA ve kinetin (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ilave edilmiştir. CH ve glutamin içermeyen besin ortamında kültüre alınan tomurcukların kabarmış olmasına rağmen sürgün gelişimi sağlanamamıştır. Besin ortamına CH (1.5 g/l) veya glutamin (200 mg/l) ilave edildiğinde sürgün gelişimi elde edilebilmiştir. Ayrıca besin ortamının 2 veya 4 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP) içermesi de sürgün gelişimini teşvik etmiştir. 1 mg/l IBA içeren Knob's besin ortamında kültüre alınan 63 adet mikro sürgünün %60'ı köklenmiş, 33 adet köklü bitkicikten %75'i dış koşullarda canlılığını devam ettirebilmiştir.

Lapins ve Sweetheart kiraz çeşitlerinin yapraklarından *in vitro* koşullarında adventif sürgün gelişimi üzerine Bhagwat ve Lane (2004) araştırma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada besin ortamlarından WPM kullanılmış ve bu ortam TDZ, NAA ve BA gibi fito-hormonlarla desteklenmiştir. Bitki rejenerasyonunun, kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin türüne ve konsantrasyonlarına, eksplant kaynağına, eksplantın ortam üzerindeki durumuna (abaxial, adaxial) bağlı olduğu belirlenmiştir. Bütün bir yaprağın orta damarına dik açı yapacak şekilde eşit aralıklarla yaprak üzerinde kesikler oluşturularak, yaprağın alt yüzeyinin TDZ'nin (2.27 ve 4.54 μ M) NAA (0.27 μ M) ile kombinasyonu ilave edilmiş besin ortamına temas edecek şekilde petrilere yerleştirilmesi ile en yüksek sürgün rejenerasyon oranı elde edilmiştir.

Osterc ve ark. (2004), *Prunus* cinsine ait 3 türden aldıkları eksplantların yüzey temizliğini farklı iki yöntemle yaparak, uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin kültürün ileri aşamalarını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Birinci yöntemde *P. avium* ve Gisela 5 çeşitlerinin tomurcukları %70'lik etanol içinde 30 sn. tutulduktan sonra, 20 g/l DICA (dikloroisosiyanurik asit) içinde 20 dakika bekletilip 3 kez steril su ile yıkanmıştır. İkinci yöntemde *Prunus subhirtella* var. *autumnalis* çeşidinin tomurcukları 16.6 g/l DICA içinde 15 dakika sterilize edildikten sonra 3 kez steril su ile yıkanmıştır. Üç türde de kültür başlangıcı, sürgün uzatma ve köklendirme için kullanılan besin ortamları aynı olduğu halde eksplantların büyüme ve gelişmeleri farklılık göstermiştir. Kültürlerdeki kontaminasyon oranlarının da farklı olduğu vurgulanmıştır. DICA'nın düşük konsantrasyonda kısa süre ile uygulanması yeterli sterilizasyonu sağlarken, bitki materyalinin canlılığını etkilememiştir. % 70'lik etanol uygulamasının ardından 20 g/l DICA ile sterilize edilen bitkisel materyalin canlılığı azalmış bunun yanında kontaminasyona da rastlanmıştır. İkinci yöntemin uygulandığı eksplantların gelişiminin hızlı, köklenme ve dış koşullara adaptasyonunun iyi olduğu belirtilmiştir.

Vasar (2004) yaptığı çalışmada mikroelementleri ve vitaminleri tam, makroelementleri yarıya indirilmiş MS besin ortamına 0.00-0.25 mM konsantrasyonlarda ilave edilen 4 farklı antioksidant (glutathione (GSH), dithiothreitol (DTT), propylgallate (PrGI), ascorbic acid (AscA))'ın Kristiina kiraz çeşidinin mikro sürgünlerinin köklenmesine ve bitkiciklerin dış koşullara alışmasına etkilerini araştırmıştır. Besin ortamına antioksidant ilave edilmesi *in vitro* köklenmeyi teşvik etmiştir. Uygulanan antioksidantlardan köklenmeyi en çok artıran DTT olmuştur. 0.25 mM DTT içeren besin ortamında kültüre alınan sürgünlerde köklenme oranı %49'dan %76'ya çıkmış, sürgün başına düşen kök sayısı da artmıştır. Antioksidantların bitkiciklerin aklimatizasyonu üzerine etkisi de farklı olmuştur. Besin ortamına ilave edilen 0.25 mM DTT veya AscA'nın, aklimatizasyondan sonra canlı bitkicik sayısını 1.6-2.1 kat artırdığı belirtilmiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2004), PR 204/84 şeftali anacında yürüttükleri çalışmada mikro sürgünlerin köklendirilmesinde değişik karbon kaynaklarının ve

kültür kapları kapatma yöntemlerinin köklenmeye olan etkileri araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak sukroz ve glukozun köklenmeye olan etkileri karşılaştırılmıştır. Kültür kaplarını kapatmak için steril pamuk, plastik kapak, parafilm ve alüminyum folyo kullanılarak bunların köklenmeye etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. 5 µM IBA içeren MS besin ortamına 88 µM sukroz yada 88 µM glukoz ilave edildiğinde köklenme oranı %100 olmuştur. Bu uygulama kök sayısı, kök uzunluğu, kökün kuru ve yaş ağırlığını da arttırmıştır. Karbon kaynağı içermeyen besin ortamında köklenme oranı %80 iken, besin ortamındaki karbon kaynağı 88 µM'ü geçtiğinde köklenme oranı düşmüştür. Kültür kaplarını kapatma yöntemleri köklenme oranını, kök sayısını ve uzunluğunu, kök kuru ve yaş ağırlığını etkilemiştir. Alüminyum folyo ile kapatılan kültür kaplarındaki sürgünlerde köklenme oranı %100 olurken, sürgün başına kök sayısı parafilm veya plastik kapakla kapatılan kaplarda belirgin şekilde artmıştır. Steril pamuk ile kapatılan kültür kaplarındaki besin ortamının 19. günde kurumaya başladığı belirtilmiştir.

Prunus cinsine ait yetişkin anaçlardan alınan eksplantlardan rejenerasyon sağlamak güçtür. Transformasyondaki en önemli engel rejenerasyondaki bu zorluktur. Pascual ve Marin (2005), ticari değeri olan, *Prunus* cinsine ait 3 çeşidin ('Marianna 2624', 'Myrobalan 605 AD', 'Adafuel') yaprak eksplantlarından rejenerasyon elde etme yöntemlerini araştırmışlardır. Besin ortamına ilave edilen BAP ve NAA, 2,4-D'ye kıyasla rejenerasyonu daha çok teşvik etmiştir. Fakat yaprakların, 1.7 µM 2,4-D içeren sıvı MS besin ortamında, 90 dakika bekletildikten sonra, 3 µM tiamin, 2.6 µM NAA, 3.5 µM BAP, 20 mg/l sukroz, 0.5 ml/l PPM (Plant Preservative Mixture) içeren, ½ QL besin ortamına aktarılması, genotiplere göre değişmekle birlikte rejenerasyonu teşvik etmiştir, Adafuel çeşidinde köklenmeyi uyarmıştır. Yaprak kınımının rejenerasyon kabiliyetinin yüksek olduğu sonucuna varılırken, aynı sürgün üzerindeki genç yapraklarla yaşlı yapraklar arasında rejenerasyon kabiliyeti açısından fark olmadığı belirtilmiştir.

Andreu ve Marin (2005), *Prunus* cinsine ait türlerin anaçlarından olan 'Adesoto 101' (*P. insititia*)'nın farklı eksplant kaynaklarının farklı kültür ortamlarında rejenerasyon olanaklarını araştırmışlardır. Mikroçoğaltım ve çelikle

çoğaltılarak elde edilen bitkilerden alınan eksplantlar farklı besin ortamlarında (MS, WPM ve QL) kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda mikroçoğaltım ile elde edilen bitkilerden alınan eksplantların daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Kültür besin ortamının kompozisyonu çoğaltım oranını etkilemiştir. 9 alt kültürden sonra QL besin ortamında elde edilen sürgün sayısının MS ve WPM besin ortamlarına kıyasla fark edilir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir.

Matt ve Jehle (2005), ekonomik değere sahip beş kiraz çeşidinin ('Schneiders', 'Sweetheart', 'Starking Hardy Giant', 'Kordia' ve 'Regina') yaprak ve boğum arası eksplantlarından *in vitro*'da adventif sürgün elde edilmesine yönelik çalışmalar yürütmüşler ve bu amaçla farklı besin ortamları (MS, WPM, QL, DKW), farklı karbon kaynakları, değişik fito-hormonların konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkileşimi, karanlık uygulaması ve etilen inhibitörü olarak kullanılan gümüş thiosülfatın etkileri değerlendirilmiştir. Bu çeşitlerle yapılan çalışmada karanlık uygulamasına tabi tutulan eksplantlardan düşük veya sıfıra yakın düzeyde rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Rejenerasyon üzerine en etkili fito-hormon kombinasyonunun TDZ+IBA olduğu, ortama gümüş thiosülfat eklemenin rejenerasyon üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı, rejenerasyon oranı üzerine bitkinin genetiksel özelliğinin ve eksplant kaynağının etkisinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Yaprak eksplantlarının %11'i ve boğum arası eksplantlarının %50' sinden adventif sürgün elde edilmiştir. Sonuç olarak araştırmada kullanılan kiraz çeşitlerinden *in vitro* sürgün rejenerasyonu için eksplant kaynağı olarak boğum arası eksplantı önerilmektedir.

Antonopoulou ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada, 1 mg/l IBA içeren MS besin ortamına 0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/l riboflavin (B₂) ilave edilerek 'GF-677' badem x şeftali mikro sürgünlerinin köklenmesine olan etkisi araştırılmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 4 hafta sonunda yapılan gözlemlerde riboflavin konsantrasyonunun artırılmasıyla sürgünlerde köklenme oranının düştüğü belirlenmiştir. Riboflavin içermeyen MS besin ortamında kültüre alınan kontrol grubundaki mikro sürgünlerde köklenme oranı %100 olurken, 2.0 mg/l riboflavin

ilave edilen ortamdaki sürgünlerde hiç köklenme görülmemiş, yapraklarda kloroz ve sürgün uçlarında da nekrozlar görülmüştür.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005), yarı kurak, kurak, kireçli, yorgun ve verimsiz topraklarda GF-677'ye alternatif olarak kullanılan şeftali x badem melezi PR204/84 anacından elde edilen mikro sürgünlerin köklendirilmesine IBA konsantrasyonlarının, farklı MS düzeylerinin (MS veya ½ MS) ve farklı periyotlarda karanlık uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. 0, 1, 2.5, 5 ve 10 µM IBA ile desteklenen MS ve ½ MS besin ortamlarında kültüre alınan bitkiciklerin yarısı 12 gün karanlık uygulamasından sonra aydınlık ortama aktarılmış, diğer yarısı karanlık uygulamasına tabi tutulmadan aydınlık ortamda kültüre alınarak köklenme oranları belirlenmiştir. En yüksek köklenme oranı 2.5 µM IBA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerde elde edilmiştir.

Pruski ve ark. (2005)'nin *Prunus fruticosa* ve *P. tomentosa* türleri ile yürüttükleri ve bu iki tür üzerinde yapılan, yayınlanmış ilk çalışma olduğu belirtilen araştırmada; BA (4.44 veya 8.88 µM)'nin NAA (0.54 µM) ve IBA (0.49 µM) ile kombinasyonlarının 10 yıllık ağaçlardan alınan boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna olan etkileri ile oksin uygulamalarının *ex vitro*'da köklenmeye olan etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar genotipe bağlı olarak değişiklik göstermiştir. *P. tomentosa* türünde en yüksek rozet oluşumu (%96), 0.54 µM NAA ile 8.88 µM BA içeren MSMO (Murashige and Skoog Minimal Organic Media) (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında elde edilirken; *P. fruticosa* türünde en yüksek rozet oluşumu (%100), 0.49 µM IBA ile 8.88 µM BA içeren MSMO besin ortamında elde edilmiştir. Ayrıca BA (0.00, 2.22, 4.44, 8.87, 22.19 µM) ve TDZ (0.0, 0.45, 0.91, 1.82 µM)'nin sürgün kardeşlenmesine etkileri araştırılmıştır. 8.88-15.15 µM BA ile desteklenmiş MSMO besin ortamı sürgün kardeşlenmesini teşvik etmiştir. 0.91 µM TDZ ilave edilen besin ortamında kaliteli sürgünler elde edilmiştir. Köklendirme çalışmaları, 15-25 mm boyundaki sürgünlerin 1:1 oranında peatmoss, perlit karışımı içeren köklendirme kaplarına aktarılmasından sonra *ex vitro*'da yürütülmüştür. 9.80/2.69 µM IBA/NAA uygulanan bitkiciklerde

%79, %0.057/0.067 IBA/NAA içeren ticari köklendirme tozu uygulanan bitkiciklerde %73 köklenme oranı elde edilmiştir.

Epinosa ve ark. (2006)'nın, mobilyacılık sektöründe ekonomik değere sahip bir tür olan *Prunus serotina*'ya ait 3 genotip ile yürüttükleri çalışmada, yaprak eksplantlarından rejenerasyon elde etme yolları araştırılmıştır. Genotip A, D ve F diye adlandırılan çeşitlerin boğum eksplantları, mikroçoğaltım amacıyla, 4.44 µM BA, 0.49 µM IBA ve 0.29 µM GA₃ içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen mikro sürgünlerden alınan yaprak eksplantları TDZ (0, 2.27, 4.54 ve 6.81 µM) ile NAA (0, 0.54, 1.07 ve 5.37 µM)'nin farklı kombinasyonları, ayrıca BA (0, 4.44, 8.88 ve 13.32 µM) ile NAA (0, 0.54, 1.07 ve 5.37 µM)'nin farklı kombinasyonları ile desteklenmiş WPM besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları üzerinde kesikler oluşturulduktan sonra besin ortamına eksplantların üst yüzleri degecek şekilde kültüre alınan materyallerin yarısı 5 hafta diğer yarısı 3 hafta karanlıkta bekletildikten sonra 16 saat fotoperiyoda tabi tutulmuştur. Besin ortamına 6.81 µM TDZ ve 1.07 µM NAA ilave edildiğinde en yüksek rejenerasyon oranı (% 38.3) elde edilmiştir. Besin ortamına 2.27 µM TDZ ve 0.54 µM NAA ilave edilerek 3 hafta karanlık ortamda kültüre alındığında yaprak başına elde edilen sürgün sayısı artmıştır (5.05 ± 1.14). 2.5 µM IBA içeren köklendirme ortamında, 7 gün karanlıkta kültüre alınan mikro sürgünlerde %27 köklenme elde edilmiştir. Köklenen bitkiciklerin % 86'sı dış koşullara alıştırılabilmektedir.

Durkovic (2006)'in yaptığı çalışmada, farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki BBD'lerin *Prunus avium*'un olgun ağaçlarından alınan boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkileri araştırılmıştır. 6 gr/dm³ agar ile katılaştırılmış WPM besin ortamına farklı konsantrasyonlarda BAP, BAP ve NAA kombinasyonları, BAP ve IBA kombinasyonları, TDZ, TDZ ve BAP kombinasyonları ilave edilerek organogenesis etkileri belirlenmiştir. Besin ortamına 0.5 mg/dm³ BAP ve 0.05 mg/dm³ TDZ kombinasyonunun ilave edilmesi sürgün kardeşlenmesini teşvik etmiştir. BAP'ın IBA ve NAA ile kombinasyonları ya da tek başına uygulanması sürgün kardeşlenmesinde önemli bir değişiklik yaratmamıştır. Besin ortamına ilave edilen düşük konsantrasyondaki BAP (0.2 ve 0.4 mg/dm³) ile

IBA (0.01 mg/dm³) veya NAA (0.01 mg/dm³) kombinasyonları sürgün uzamasını uyarmıştır. Köklendirme ortamı IBA veya IBA ile 2,4-D kombinasyonunu içeren ½ WPM'den oluşmuştur. En yüksek köklenme oranı (%73.3) 0.3 mg/dm³ IBA içeren köklenme ortamında elde edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2006-2007 yıllarında, Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Başlangıç materyali olarak, Frutaş fidancılıktan temin edilerek, Mart ayında Ziraat Fakültesi Eyyübiye Yerleşkesine dikilen, 5 adet, 2 yaşlı ve sertifikalı GF-677 anaçlarının yeşil sürgünlerindeki boğumlar kullanılmıştır. Vejetasyon döneminin başlamasıyla birlikte su stresini önlemek ve sağlıklı bir sürgün gelişimi sağlamak amacıyla anaçlara gerektiği zaman gerekli miktarda su verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki materyalinin (eksplant) yüzeysel sterilizasyonu

Yeşil sürgünlerin, yaprakları çıkarıldıktan sonra üzerinde bir tomurcuk bulunduracak şekilde 20 mm'lik yeşil çelikler şeklinde kesilmiştir. Bu yeşil çelikler su kaybına uğramamaları için; içinde su bulunan bir kapla laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarda musluk suyu altında 30 dakika (dk.) tutulan çelikler, %70'lik etil alkol içinde 1 dakika tutulduktan sonra steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra, bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sodyum hipoklorit (NaOCl) konsantrasyonunu belirlemek amacı ile yeşil çelikler bir-iki damla Tween 20 içeren %5, 8 ve 10'luk ticari çamaşır suyu (%0.525 NaOCl) içerisinde 15 dakika yüzey temizliğine tabii tutulduktan sonra 5'er dk. 3 kez steril distile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Daha sonra sterilizasyonu tamamlanmış eksplantlar 1 mg/l BA, 30 g/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.6'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış MS kültür ortamına transfer edilmişlerdir. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra, kültür ortamındaki enfekte olan, sağlıklı ve canlılığını

kaybetmiş eksplant oranları % olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

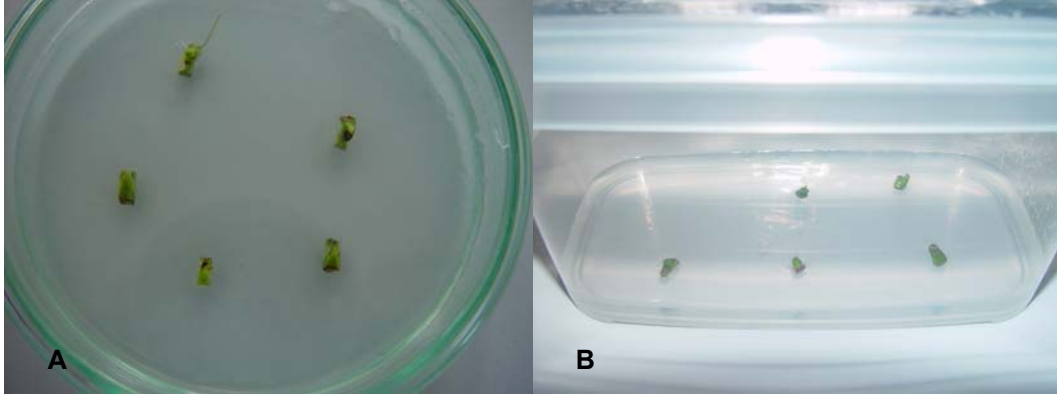
Çalışmada kullanılan test tüpler, petriler, pensler, bistüriler ve fayanslar alüminyum folyoya sarılarak 121⁰C'de, 1 atm. basınç altında, 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışma süresince kullanılan pens ve bistüriler %96'lık etil alkole batırıldıktan sonra mavi aleve tutularak sık sık sterilize edilmiştir. Çalışmaya başlamadan en az 15 dk. önce steril kabin çalıştırıldıktan sonra içi %70'lik etil alkol ile temizlenmiş buna ek olarak 15 dk. süre ile UV lambası açık tutulmak suretiyle kabinin sterilizasyonu tamamlandıktan sonra kabinde çalışmaya başlanılmıştır. Hazırlanan besin ortamları 121⁰C'de, 1 atm. basınç altında, 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.3. Kültür şartları

Bu çalışmada kullanılan iklim kabininin ışık yoğunluğu 2 500-3 000 lüks'e ayarlanmış olup, 16 saat (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) fotoperiyot uygulanacak şekilde programlanmıştır. Ortam sıcaklığı 24±1⁰C'de tutulmuştur. İklim odası 2 500-10 000 lüks ışık şiddetine sahip olup, zaman ayarlayıcı ile 16 saat fotoperiyot uygulaması gerçekleştirilmiştir. İklim odasının sıcaklığı klima ile, nemi nemlendirici ile sağlanmıştır.

3.2.4. Boğum eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması

Yüzeysel sterilizasyonu tamamlanan yeşil çelikler üzerinde bulunan tomurcuklar, odun dokusundan ayrıldıktan sonra, 30 veya 60 ml başlangıç kültür ortamı içeren petri kutularına ya da kültür kaplarına dikilmiştir. Petri kutularına 5'er adet, kültür kaplarına 6-8'er adet boğum yerleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A; Başlangıç kültür ortamı içeren petri kutusu, B; başlangıç kültür ortamı içeren kültür kabı

Boğum eksplantları, başlangıç kültür ortamında rejenerasyon denemelerinde kullanılabilir şekil ve sayıda yaprak ve sürgün elde edilinceye kadar 3'er haftalık aralıklarla altkültüre alınmıştır. Sürgün çoğaltımının sağlanması için, yeni elde edilen sürgün kümecikleri bireysel sürgünler şeklinde ayrılarak kardeşlenme sayıları belirlenmiş ve taze kültür ortamı üzerine transfer edilmiştir. Başlangıç kültür ortamı olarak kullanılan, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l benziladenin (BA), 30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar, mineral ve vitaminleri içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) kültür ortamının pH'sı, otoklavlanmadan hemen önce 5.6'ya 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan kültür ortamı 121°C de 20 dk. sterilize edilmiştir.

3.2.5. Sürgün rejenerasyonu için yaprak eksplantlarının kültüre alınması

GF-677 anacının yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için, başlangıç kültüründe elde edilen 3 haftalık *in vitro* sürgünlerinin uçtan itibaren genç yaprakları hasat edilerek steril saf su içerisine konulmuştur. Daha sonra her yaprağın orta damarına dik olacak şekilde eşit aralıklarla kesikler oluşturulmuştur. Kesikli yaprakların üst yüzü kültür ortamının üzerine tamamen temas edecek şekilde 9 cm çapındaki petri kutulara yerleştirildikten sonra etrafı parafilm ile sarılmıştır. Her petri kutuya 5 yaprak aktarılmıştır. Karanlık bir ortam elde etmek için petri kutular alüminyum folyo ile sarılmıştır. Yaprak eksplantları, 3 hafta sonunda altkültüre alındıktan sonra, ışık yoğunluğu 2 500-3 000 lüks olan ve 16 saat fotoperiyot uygulanan iklim kabininde kültüre alınmaya devam edilmiştir.

Araştırmada yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve kalluslardan da adventif sürgün oluşumları üzerine, 1-fenil-3-(1,2,3,-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ-thidiazuron) (0.1, 0.2, 0.4 mg/l) ve BA (0.1, 0.2, 0.4 mg/l)'nin yalnız kendi konsantrasyonları veya NAA (naftalinasetikasit) (0.1, 0.2 mg/l) ile kombinasyonundan oluşan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri araştırılmıştır. Sürgün rejenerasyonu için kullanılan kültür ortamı, mineral ve vitaminleri içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962), farklı konsantrasyon ve kombinasyonda TDZ, BA ve NAA, 30 g/l sukroz ve 5.0 g/l agar (Duchefa plant agar)'dan oluşmuştur. Kültür ortamının pH'ı, sterilizasyondan önce 5.6'ya 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamı daha sonra 121°C de 20 dk. sterilize edilmiştir.

3.2.6. Kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu

İn vitro'da kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu sağlamak amacı ile, sürgün çoğaltma ortamında elde edilen sürgün kümecikleri bireysel sürgünler şeklinde ayrılarak her birinde 15 ml, 1.0 mg/l BA, 30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamı bulunan test tüpleri içine transfer edilmiştir. Besin ortamının pH'ı otoklavlanmadan önce 5.6'ya 1 N HCl veya NaOH ile ayarlanmıştır. Test tüplerinin kapağı parafilm ile sarılarak kültüre alınmıştır. İki kez altkültüre alınan eksplantlarda kardeşlenme sayıları belirlenmiştir.

3.2.7. Mikro sürgünlerin boylarının uzatılması

Kallus dokusundan elde edilen mikro sürgünler boylarının uzaması ve gövdelerinin kalınlaşması amacıyla, her birinde 60 ml, 0.0, 0.1, 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamı bulunan kültür kaplarına aktarılmıştır. Sürgün uzatma besin ortamlarının içeriği, BBD konsantrasyonları dışında başlangıç ortamı ile aynı hazırlanmıştır. Sürgün uzatma besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin boyu 3 hafta sonunda ölçülmüştür.

3.2.8. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi

İn vitro'da sürgünlerin dip kısımlarındaki kallustan elde edilen ve uzatma ortamında kültüre alınan 25-40 mm boyundaki sürgünler 25x150 mm'lik test tüpleri içerisine transfer edilerek tüplerin kapakları parafilm ile sarılmıştır. Sürgün köklendirme besin ortamı 0.05, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l IBA (indole-3-bütirik asit), 30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar içeren ½ MS'den oluşmuştur. Köklendirme besin ortamının pH'ı, sterilizasyondan önce 5.6'ya 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

3.2.9. Dış koşullara alıştırma (aklimatizasyon)

İn vitro koşullarında köklendirme ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerin kökleri yıkanarak agardan temizlendikten sonra steril perlit, torf veya 1:1 oranında torf, perlit içeren plastik kaplara şaşırtılmıştır. Nemli bir dış ortam sağlamak amacıyla bitkiciklerin üzeri saydam kaplarla kapatılmıştır. Dış koşullara alıştırma işleminin başlangıcından 3 hafta sonra kaplar her gün artan sürelerle (5-10 dk.) açılarak, bitkicikler dış koşullara alıştırılmaya çalışılmıştır. 8 hafta sonunda dış koşullara alışan bitkiciklerin canlılık oranları tespit edilerek, 1:1 oranında torf, perlit karışımından oluşan ortam içeren 10x10 cm ebadındaki saksılara aktarılmıştır. Alıştırma süresince bitkiciklerin besin ihtiyaçları, haftada bir kez sulama suyu ile birlikte verilen ½ Hoagland besin çözeltisi ile karşılanmıştır.

3.2.10. İstatistiksel değerlendirme

GF-677 hibrit anacının *in vitro* rejenerasyonu çalışmasında araştırma sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi tesadüf parselleri deneme desenine göre yapılmış olup, araştırma birbirinden bağımsız olarak 3 defa tekrarlanmış ve herbir bağımsız deneme 12 sürgünden oluşacak şekilde düzenlenmiştir. İstatistiki olarak önemli görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ düzeyinde LSD testine tabi tutulmuşlardır. Sayılarak elde edilen oransal (%) verilere ise açı transformasyonu uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bitki Materyalinin Yüzeysel Sterilizasyonu

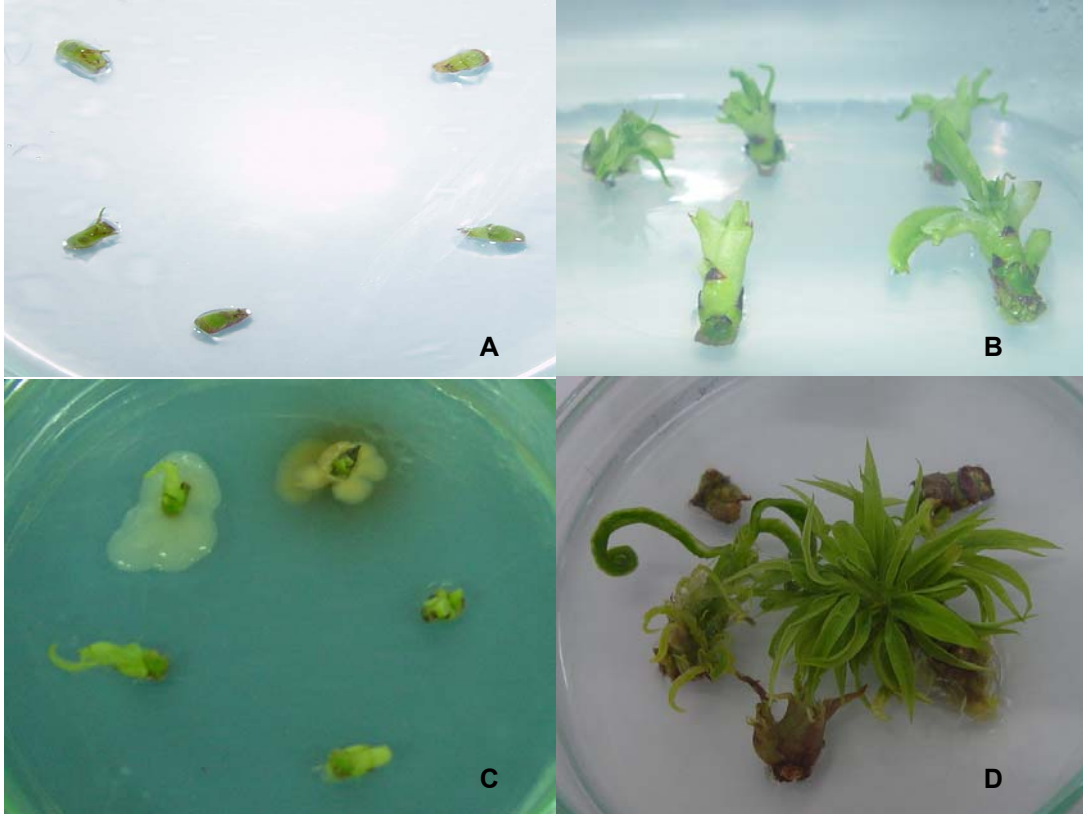
In vitro çalışmalarda bitki materyallerinin etkili bir şekilde sterilizasyonu başarıyı etkileyen faktörlerin başında gelir. Bu nedenle, çalışmada ilk ve en önemli aşama kullanılacak olan bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon metodunun belirlenmesidir. Sterilizasyon yöntemleri anaç bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda en yaygın kullanılan dezenfektanlar; etanol, kalsiyum, sodyum hipoklorit, gümüş nitrat, hidrojen peroksit ve civa klorürdür (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sodyum hipoklorit (NaOCl) konsantrasyonunu belirlemek amacı ile araştırmada kullanılan bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu %5, 8 ve 10 konsantrasyonlardaki NaOCl solüsyonu içinde yapılmıştır. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra, enfekte olan, sağlıklı ve canlılığını kaybetmiş eksplant oranı (%) belirlenmiştir. Üç haftalık bir gelişme periyodunun sonunda, yüzeysel sterilizasyonu %8 ve 10'luk NaOCl içinde yapılan eksplantlar kültür ortamında normal gelişimlerine devam ederken, yüzeysel sterilizasyonu %5'lik NaOCl içinde yapılarak kültüre alınan eksplantların kültür ortamlarında %32.0 oranında kontaminasyon meydana gelmiştir. Yüzeysel sterilizasyonunda kullanılan %10'luk NaOCl, eksplantların %29.0'unun dokularına zarar vererek ölümüne sebep olmuştur fakat kültür ortamında herhangi bir kontaminasyon meydana gelmemiştir. Yüzeysel sterilizasyonunda %8'lik NaOCl kullanıldığında bitki dokuları daha az (%20.2) zarar görmüştür. Deneme sonunda NaOCl konsantrasyonlarının eksplant yüzeysel sterilizasyonu üzerine etkinlikleri arasında istatistiki olarak fark görülmüş, en uygun NaOCl konsantrasyonunun %8 olduğu belirlenmiştir. Araştırmanın devamındaki bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonunda %8'lik NaOCl kullanılmıştır (Şekil 4.1) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı NaOCl konsantrasyonlarının bitkisel materyal yüzey sterilizasyonundaki etkinliği

Uygulama	Enfekte olan eksplant (%)	Sağlıklı eksplant (%)	Canlılığını kaybeden eksplant (%)
% 5 NaOCl	32.0	54.6 c	13.5 a
% 8 NaOCl	00.0	69.7 a	20.2 b
% 10 NaOCl	00.0	61.6 b	29.0 c

1mg/l BA, 30 g/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren MS *in vitro* sürgün ortamı. a,b,c: Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda NaOCl solüsyonu içinde yüzeysel sterilizasyonları yapılan eksplantların gelişme durumu. A; kültüre alınan boğum eksplantlarının kültür başlangıcı, B; sağlıklı sürmüş boğum eksplantları, C; enfekte olmuş boğum eksplantları, D; yüzey sterilizasyonu aşamasında canlılığını kaybetmiş boğum eksplantları

Eksplantın türü (boğum, boğum arası, tohum, sürgün ucu vb.) sterilizasyon yöntemini doğrudan etkilemektedir. Bundan dolayı, yapılan birçok araştırmada çok farklı uygulamalar yapılmıştır. Genel olarak *in vitro* çalışmalarının başlangıcındaki eksplantların sterilizasyonu, eksplantların yüzey direncini kırmak için kullanılan bir iki damla Tween-20 içeren %0.5-15'lik NaOCl, CaOCl veya HgCl₂ solüsyonunda 6-20 dk. süre ile çalkalandıktan sonra 5'er dk. 3 kez steril saf su ile çalkalanarak tamamlanmıştır (Ainsley ve ark., 2001a; Channuntapipat ve ark., 2003). Buna karşılık sterilizasyonu birkaç aşamada gerçekleştiren araştırmacılar vardır. Bazı

araştırmacılar (Gürel ve Gülşen, 1998b; Ainsley ve ark., 2000; Ainsley ve ark., 2001b; Pruski ve ark., 2005) eksplant yüzeysel sterilizasyonuna geçmeden önce eksplant kaynaklarını musluk suyunun altında farklı sürelerde (5 dk.-2 saat) tutarak kaba temizliğini yapmıştır. Muna ve ark. (1999) eksplant kaynaklarını sadece musluk suyunun altında tutmayı kaba temizlik için yeterli görmeyerek bir iki damla Tween-20 ile 10-15 dakika yıkadıktan sonra asıl yüzeysel sterilizasyonuna geçmişlerdir. Jain ve Babbar (2003)'da aynı şekilde kullanacakları sürgünleri önce %10 (v/v) Teepol ile yıkayıp 30 dk. musluk suyu altında tuttuktan sonra asıl yüzeysel sterilizasyonuna başlamışlardır. Espinosa ve ark. (2006); Jain ve Babbar (2000), eksplantları kısa bir süre (30 sn.-5 dak.) etanolde (%50-70) beklettikten sonra ticari çamaşır suyu kullanılarak bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonunu tamamlamışlardır. Matt ve Jehle (2005), 5 kiraz çeşidine ait 1 yaşlı dallardan aldıkları tomurcukları önce %1.5 (w/v) Benomyl içinde 10 dk. beklettikten sonra, %10 (w/v) CaOCl içinde 20 dk. bekleterek daha detaylı bir sterilizasyon gerçekleştirmişlerdir. Jain ve Babbar (2003)'ün yürüttüğü çalışmada, *Syzygium cuminii* türüne ait 30 yaşlı ağaçlardan alınan o yılın sürgünleri laboratuvara 50 mg/l askorbik asit ve 100 mg/l sitrik asit karışımı içeren bir kap içinde getirildikten sonra sürgünler %10 (v/v) Teepol ile yıkayıp, 30 dk. musluk suyu altında durulanmıştır. %50 (v/v) etanol içinde 5 dk. tutulduktan sonra, %0.2 (w/v) merkürük klorit ile 25 dk., %0.2 (w/v) Bavistin (fungisit) ile 20 dk. muamele edilmiştir. Son olarak 10 dk. %0.1 (w/v) NaOCl içinde tutulduktan sonra birkaç defa steril saf su ile durulanarak eksplantın yüzeysel sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Bu çalışmada, yüzeysel sterilizasyonu %8'lik NaOCl dezenfektant solüsyonu içinde yapılan boğum eksplantlarıyla başlatılan kültürlerde herhangi bir kontaminasyon meydana gelmemiş olup, *in vitro* sürgünlerde herhangi bir morfolojik değişim görülmeden, gelişimlerine devam etmişlerdir. Dolayısıyla yukarıda verilen araştırmalarda kullanılan farklı sterilizasyon yöntemlerinin yürütülmüş olan bu çalışmada kullanılan eksplantın yüzeysel sterilizasyonunda uygulanmasına gerek olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada kullanılan eksplantın yüzeysel sterilizasyonu için %8'lik NaOCl dezenfektan solüsyonu en uygun konsantrasyon

olarak bulunmuş ve araştırma sürecinde eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda bu konsantrasyon kullanılmıştır.

4.2. Boğum Eksplantlarından Sürgün Gelişimi ve Kardeşlenme

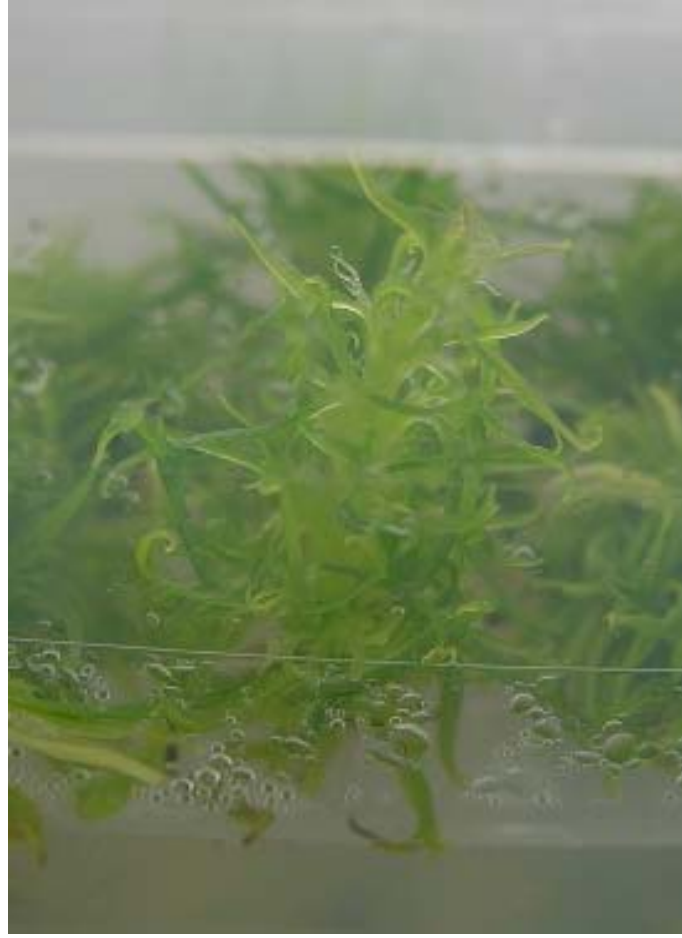
30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamına ilave edilen 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l BA'nın 'GF-677' boğum eksplantlarından sürgün gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra, altkültüre alınabilecek eksplant, gelişmemiş eksplant ve camlaşmış eksplant oranı (%) belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Boğum eksplantlarından sürgün gelişimi

Bitki Büyüme Düzenleyici BA (mg/l)	Altkültüre Alınabilecek Eksplant (%)	Gelişmemiş Eksplant (%)	Camlaşmış Eksplant (%)
0.5	64.5 b	25.4	0.0
1.0	74.8 a	0.00	15.0
2.0	37.7 c	31.6	36.2

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)

1.0 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantları 4. günden itibaren sürmeye başlamıştır, 3. haftanın sonunda eksplantların %74.8'i altkültüre alınabilecek büyüklüğe ulaşmıştır. 0.5 ve 2.0 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantları ise ancak 7-10. günden itibaren sürmeye başlamıştır ve 3. haftanın sonunda 0.5 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantların %64.5'i, 2.0 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantların %37.7'si altkültür yapılabilecek büyüklüğe ulaşmıştır. 2.0 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantların %36.2'sinde camlaşma (hiperhidrisite) görülmüştür (Şekil 4.2). Birbirinden bağımsız olarak yürütülen 3 ayrı denemenin sonuçlarından elde edilen veriler değerlendirilerek 0.5 ve 1.0 mg/l BA kültür ortamında elde edilen sürgünler aynı BBD konsantrasyonu içeren besin ortamında altkültüre alınırken, 2.0 mg/l BA uygulamasına son verilmiştir.



Şekil 4.2. 2.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantlarından gelişen camlaşmış *in vitro* sürgün

Üç haftalık gelişme periyodu sonunda, altkültüre alınan eksplantlarda kardeşlenme sayıları belirlenmiştir. 0.5 ve 1.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan *in vitro* sürgünlerin kardeşlenme sayıları farklı bulunarak, 0.5 ve 1.0 mg/l BA'nın kardeşlenme üzerine etkisi ortaya konmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan BA'nın boğum eksplantlarından elde edilen kardeşlenme sayısı üzerine etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Kardeşlenme Sayısı (adet)						
	1.alk.	2.alk.	3.alk.	4.alk.	5.alk.	6.alk.	Ort.
BA (mg/l)							
0.5	3.2	3.05	5.2	3.0	-	-	3.61 b
1.0	3.1	5.6	8.3	12.8	8.5	8.3	7.76 a

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($P < 0.05$)

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, 1.0 mg/l BA içeren besin ortamında 3 hafta aralıklarla altkültüre alınan eksplantların kardeşlenme sayıları 4. altkültüre kadar artmış 5. ve 6. altkültürlerde azalma kaydedilmiştir. En yüksek kardeşlenme sayısı (12.8 adet), 4. altkültürde elde edilmişken en düşük kardeşlenme sayısı 1. altkültürde bulunmuştur. 4. altkültürden sonra kardeşlenme sayısı azalmakla birlikte elde edilen sürgünlerin gelişmesinde de zayıflama görülmüştür. 6. altkültürden sonra kültüre devam edilmemiştir. 0.5 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantlardaki kardeşlenme sayıları 3. altkültürde artmış daha sonra azalma göstermiştir. En yüksek kardeşlenme sayısı (5.2 adet), 3. altkültürde elde edilmiştir. 0.5 mg/l BA içeren besin ortamındaki eksplantlardaki kardeşlenme sayısı yeterli görülmediğinden 4. altkültürden sonra uygulamaya son verilerek araştırmanın devamında sürgün çoğaltımı için 1.0 mg/l BA kullanılmıştır.

İn vitro çalışmalarda kullanılan başlangıç bitki parçası eksplant olarak adlandırılmaktadır. *İn vitro* çalışmalarının başarısında eksplant seçimi son derece önemlidir. Teorik olarak bütün bitki hücreleri totipotenttir (Babaoğlu ve ark., 2002). Bitki hücrelerinin bu özelliğinden dolayı normal şartlarda, herhangi bir bitki parçası *in vitro* çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir fakat günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Prunus* cinsine ait türlerde yaygın olarak; sürgün ucu (Hammat ve Grant, 1998; Gürel ve Gülşen, 1998; Kamali ve ark.,1999; Muna ve ark.,1999; Gentile ve ark., 2002; Channuntapipat ve ark., 2003; Bhagwat ve Lane, 2004), boğumlar (Muna ve ark., 1999; Ainsley ve ark., 2000; Ainsley ve ark., 2001b; Tang ve ark., 2002; Jain ve Babbar, 2003; Pruski ve ark., 2005; Matt ve Jehle, 2005; Espinosa ve ark., 2006; Durkovic, 2006), tohum (Jain ve Babbar, 2000), yaprak (Hammat ve Grant, 1998; Ainsley ve ark., 2000; Perez-Tornero ve ark., 2000; Gentile ve ark., 2002; Tang ve ark., 2002; Bhagwat ve Lane, 2004; Matt ve Jehle, 2005; Pascual ve Marin, 2005; Espinosa ve ark., 2006), kotiledon, hipokotil ve kök gibi fide organları (Ainsley ve ark., 2001a) kullanılmıştır.

Bu çalışmada ise başlangıç materyali olarak boğumlar, sürgün rejenerasyonu için *in vitro* mikro sürgünlerin yaprakları ve sürgün diplerinde oluşan kallus eksplant olarak kullanılmıştır.

4.3. Yaprak Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu

Besin ortamı üzerine yaprakların üst yüzeyi ortamlarla temas edecek şekilde yerleştirilen yaprak eksplantları 5-7. gün sonunda orijinal büyüklüğünün 2 katına ulaşmıştır. Fakat kültür ortamına aktarıldıktan kısa bir süre sonra yaprak eksplantları orta damar boyunca kıvrılmıştır (Şekil 4.3). Bu durumda, rejenerasyon beklenen, yaprak eksplantlarının kesik uçlarının kültür ortamı ile teması azalmıştır. Problemin çözümüne yönelik olarak yapılan literatür taraması ve ön denemeler sonunda, kültür başlangıcında uygulanan 3 haftalık karanlık periyot ve besin ortamındaki agar miktarının azaltılması ile problem ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 4.3. 0.1 mg/l BA 30 g/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamında kültüre alınan ve orta damar boyunca kıvrılan yaprak eksplantlarının kültür başlangıcından 10 gün sonraki görünümü

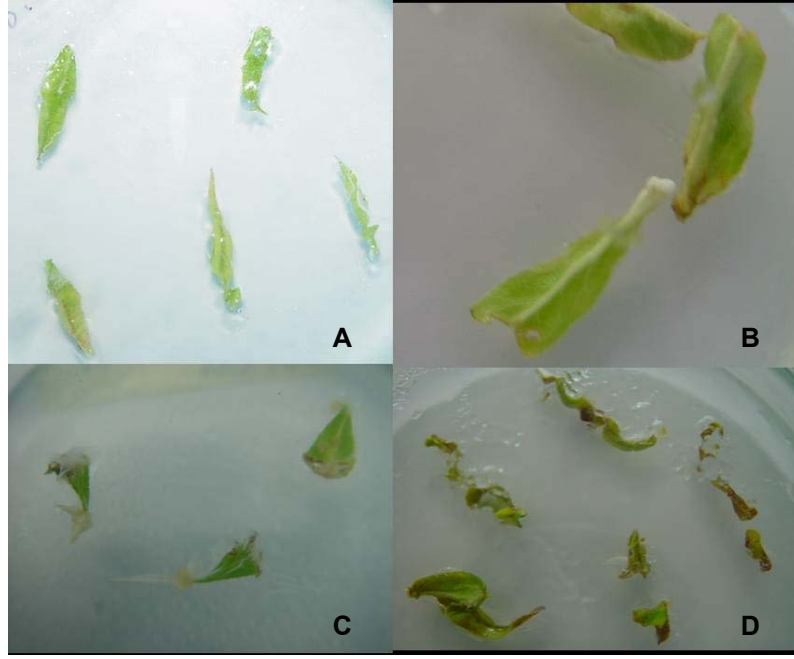
Kültüre alınan yaprak eksplantlarında meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Bitki büyüme düzenleyicilerinin GF-677'nin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

Bitki Büyüme Düzenleyici (mg/l)		1. Altkültür	2. Altkültür	3. Altkültür	4. Altkültür
BA	NAA				
0.1	0.0	Ky	En	-	-
0.2	0.0	Ky	En	-	-
0.4	0.0	Ky	En	-	-
0.1	0.1	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.2	0.1	Ko	Kb	Kd	Kr, En
0.4	0.1	Ko	Kb	Kd	Kr, En
0.1	0.2	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.2	0.2	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.4	0.2	Ko	Kb	Kk	
TDZ	NAA				
0.1	0.0	Ko	Kd, En	Kr, En	-
0.2	0.0	Ko	Kd, En	Kr, En	-
0.4	0.0	Ko	Kd, En	Kr, En	-
0.1	0.1	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.2	0.1	Ko	Kd	Kd, En	Kr, En
0.4	0.1	Ko	Kd	Kd, En	Kr, En
0.1	0.2	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.2	0.2	Ko	Kb	Kk	Kr, En
0.4	0.2	Ko	Kb	Kd, En	Kr, En

Ky; Kallus oluşumu yok, **Ko**; Kallus oluşumu, **Kb**; Kallus büyümesi, **Kk**; Kallustan kök oluşumu, **Ks**; Kallustan sürgün oluşumu, **Kr**; Kallus kararması, **Kd**; Kallus büyümesinde durgunluk, **En**; Eksplantlarda nekroz oluşumu

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, yalnız BA içeren MS kültür ortamları hariç, diğer kültürlerle 3 hafta karanlık uygulamasından sonra yaprak eksplantlarının kesik yerlerinde kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.4B). NAA içermeyen farklı konsantrasyonlarda BA içeren kültürlerde 2. altkültürde ve 3. altkültürde TDZ'nin tek başına uygulandığı kültürlerde yaprak eksplantlarında nekrozlar oluşmuş (Şekil 4.4D), 4. altkültürde kalluslarda kararmalar meydana gelmiştir. Kültür ortamına NAA ilave edilmesi eksplantlarda köklenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 4.4C). Sağlıklı görünen kültürler de 3. altkültürden sonra bozulmaya başlayarak 4. altkültürde kallus dokuları tamamen kararmış, yaprak eksplantlarında nekrozlar oluşmuştur. 4 kez altkültür yapılan yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir.



Şekil 4.4. A; 0.4 mg/l BA, B; 0.2 TDZ + 0.1 NAA, C; 0.1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren, D; 0.1 mg/l BA içeren kültür ortamında ültüre alınan yarak eksplantları

Prunus cinsine ait çeşitlerin yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu çalışmalarında yaprağın yaşı, besin ortamındaki pozisyonu, yaprağın kısımları rejenerasyon oranında etkili bulunmuştur. Pascual ve Marin, (2005)'nin *Prunus* cinsine ait 3 çeşitte yaptığı araştırmada, yaprağın yaşının rejenerasyonda fark yaratmadığı belirtilse de, Hammatt ve Grant, (1998); Ainsley ve ark., (2000); Gentile ve ark., (2002); Tang ve ark., (2002); Bhagwat ve Lane, (2004); Matt ve Jehle, (2005); Epinosa ve ark., (2006)'nın yaptıkları çalışmalarda genç yaprakların daha rejeneratif oldukları vurgulanmıştır. Hammatt ve Grant, (1998); Ainsley ve ark., (2000); Tang ve ark., (2002); Bhagwat ve Lane, (2004); Pascual ve Marin (2005); Matt ve Jehle, (2005) yaptıkları araştırmalarda yaprak eksplantlarını, besin ortamına alt yüzleri temas edecek şekilde yerleştirmişlerdir. Perez-Tornero ve ark., (2000); Gentile ve ark., (2002) ve Epinosa ve ark., (2006) ise eksplantların üst yüzü besin ortamına temas edecek şekilde yerleştirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda yaprağın sap tarafındaki yarısının daha rejeneratif olduğunu ortaya koymuşlardır. Matt ve Jehle, (2005) 5 farklı kiraz çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada; genotipin, eksplant türünün, besin ortamının, BBD'lerin konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün rejenerasyon oranına etkileri ortaya konmuştur. Araştırma sonuçlarına göre boğum arası eksplantlarının totipotensi

kapasitesinin yaprak eksplantlarından daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için ½ DKW ve ½ WPM karışımı en uygun besin ortamı olarak belirlenirken, boğum arası eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için en uygun besin ortamının QL olduğu açıklanmıştır. 5 farklı çeşidin yaprak eksplantları, aynı komponentleri içeren besin ortamında kültüre alındığında sadece bir çeşidin yaprak eksplantlarının %16.7 rejenerasyon gösterebildiği diğer 4 çeşidin yaprak eksplantlarının hiç sürgün rejenerasyonu göstermediği belirtilmiştir. Ainley ve ark., (2000)'nin Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitlerinin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, kültür ortamına %0.1 CH ilave edildiğinde Ne Plus Ultra çeşidine ait yaprak eksplantlarından rejenerasyon oranı %19.4'ten %44.4'e yükseldiği halde Nonpareil çeşidine ait yaprak eksplantlarından rejenerasyon oranı değişmemiştir (%5.5). Gentile ve ark., (2002)'nin 5 farklı şeftali çeşidi ile yaptıkları çalışmada, yaprak eksplantları yaprak sapı ile birlikte kültüre alındığında rejenerasyon gösterirken yaprak sapı olmayanlarda rejenerasyon elde edilememiştir. Aynı çalışmada, yaprak eksplantlarının alındığı *in vitro* sürgünlerin kültür şartlarının yapraklarından rejenerasyon oranını etkilediği vurgulanmıştır. Perez-Tornero ve ark., (2000), yürüttükleri çalışmada Helena kayısı çeşidinin yaprak eksplantlarının kültür ortamına yerleştirilme şeklinin sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, yaprak eksplantları üst yüzleri kültür ortamına temas edecek şekilde yerleştirildiklerinde yaprak eksplantlarının daha rejeneratif oldukları vurgulanmıştır.

Prunus cinsine ait türlerde yapılan bazı çalışmalarda yaprak eksplantlarından rejenerasyon elde edebilmek için yüksek BBD konsantrasyonları kullanılmıştır. Ne Plus Ultra badem çeşidinin yaprak eksplantları 2 mg/l IBA, 5 mg/l TDZ ve %0.1 CH içeren AP besin ortamında kültüre alındığında %44.4 rejenerasyon elde edilmiştir (Ainsley ve ark., 2000). Sweetheart kiraz çeşidinin yaprak eksplantları 2 mg/l TDZ ve 0.5 IBA içeren QL besin ortamında kültüre alındığında %10 rejenerasyon elde edilmiştir (Matt ve Jehle, 2005). Helena kayısı çeşidinin yaprak eksplantları 2 mg/l TDZ ve 0.5 NAA içeren QL besin ortamında kültüre alındığında %24.3 rejenerasyon elde edilmiştir (Perez-Tornero ve ark., 2000).

Yukarıda açıklanan araştırmaların sonuçları da göstermiştir ki; doku kültürü çalışmalarında seçilen eksplantın tipi, kültür ortamına yerleştirilme şekli, kültür ortamının içeriği, besin ortamının türü gibi pek çok faktör başarıyı etkilemektedir. GF-677 badem anacının yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde edilebilmesi için, kültür ortamının içeriğinin, besin ortamı türünün (MS, QL, WPM vb.), BBD'lerin konsantrasyon ve kombinasyonlarının denenmesi gerekmektedir.

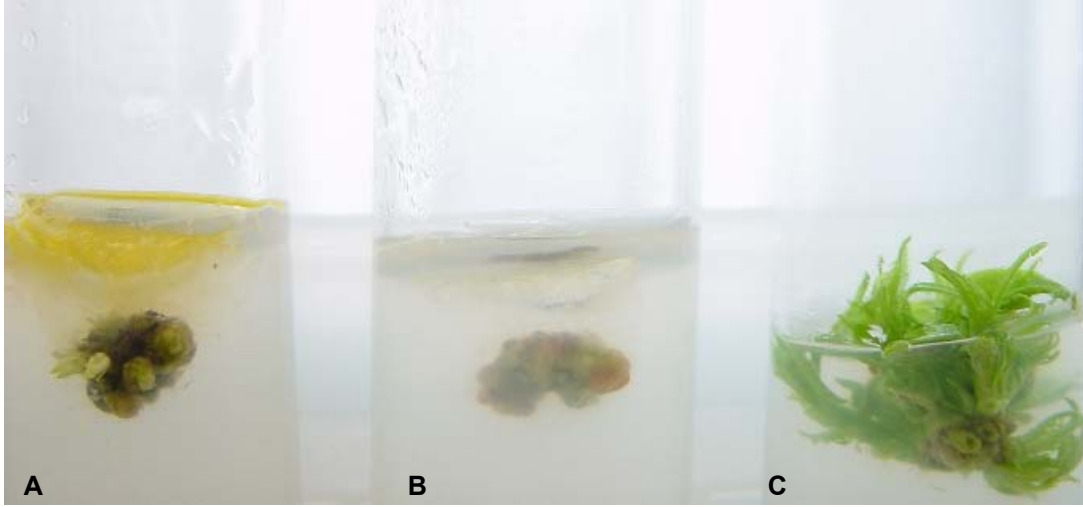
4.4. Kallus Dokusundan Sürgün Rejenerasyonu

Altkültürle *in vitro* sürgün çoğaltılması sırasında, kültüre alınan sürgünlerin dip kısmında canlı, beyaz renkli yoğun kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



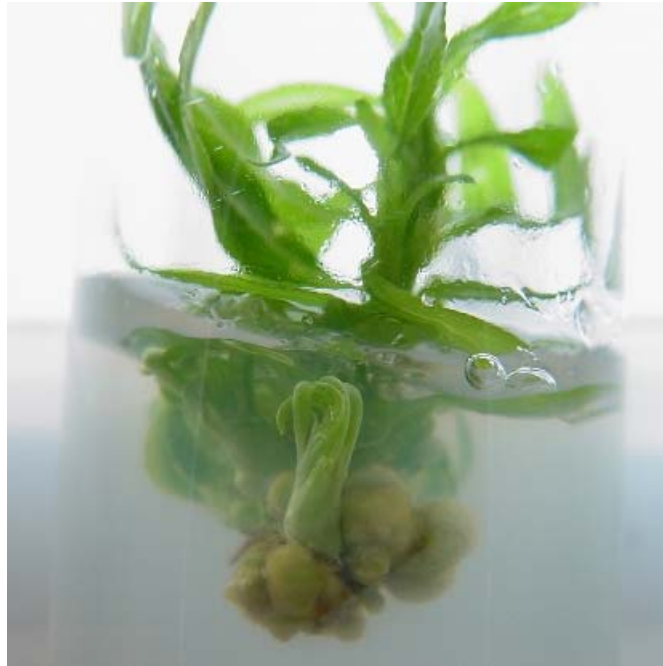
Şekil 4.5. *In vitro* sürgünlerin dip kısmında oluşan beyaz renkli, yoğun, 3 haftalık kallus dokusu

Haftalık gözlemler sonucunda bu kalluslardan sürgün rejenerasyonu olduğu belirlenmiştir ve kalluslardan bitki rejenerasyonunun daha açık şekilde görülmesi için, sürgünlerin dibindeki kalluslar ayrılarak 1.0 mg/l BA içeren MS kültür ortamında kültüre alınmıştır. Karanlık ya da aydınlık ortamda kültüre alınan kalluslarda fenolik madde salgısı gözlenmiştir. Kalluslarda kabaran adventif tomurcuklar olduğu halde rejenerasyon meydana gelmemiş (Şekil 4.6) ve 4. hafta sonunda kalluslarda kararma ve hücre ölümleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. **A ve B** *in vitro* sürgünlerin dip kısmında oluşan kallus dokusunun sürgünden ayrılarak kültüre alınması sonucunda test tüplerinde fenolik madde birikimi, **C** sürgün dibinden ayrılmadan kültüre alınan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu. 3 haftalık kalluslar ve 5 haftalık *in vitro* sürgünler

Fenolik salgının kesik yüzeylerden oluştuğu düşünülerek, sürgün diplerindeki kallus kesilmeden sürgün ile birlikte altkültüre alındığında, bu kallus dokularından %63.4 oranında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Şekil 4.6; Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *In vitro* sürgünlerin dip kısmında oluşan kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu, 2. altkültür aşamasındaki *in vitro* sürgün yaklaşık 6 haftalık

Kallustan sürgün rejenerasyonu sağlamak için, sürgün çoğaltma ortamında kültüre alınan sürgünler 0.0, 0.5 veya 1.0 mg/l BA içeren MS kültür ortamına transfer edilerek 3'er haftalık periyotlarla iki kez altkültüre alınmıştır. Birinci altkültürde gelişen kallustan ikinci altkültürde ortalama olarak eksplant başına 8.6 adet sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır (Çizelge 4.5). Rejenere olan sürgünler ayrılarak sürgün uzatma ortamında kültüre alınmıştır. Oluşan yeni sürgünlerin kalluslardan mı yoksa ana bitki kaynağına bağlı olarak gelişen adventif sürgünler mi olup olmadıklarının ortaya konması için yeni oluşan sürgünlerin kallusla bağlantı yerlerinden enine kesitler alınarak mikroskop altında incelenmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.5. GF-677 hibrit anacının kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu

Bitki Büyüme Düzenleyici BA (mg/l)	Adventif Sürgün Sayısı (adet)		
	1. Altkültür	2. Altkültür	Ortalama
0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	0.0	0.0
1.0	0.0	8.6	4.3

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)

4.5. Kallustan Elde Edilen Mikro Sürgünlerin Boylarının Uzatılması

Kallus dokusundan rejenerasyon sonucu elde edilerek boylarının uzatılması amacıyla 0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l konsantrasyonlarında BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin boyları kültür başlangıcından 3. hafta sonunda ölçülerek belirlenmiştir (Çizelge 4.6). 0.0 veya 0.1 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin boylarındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmazken, 0.5 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin boylarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Araştırmanın devamında, mikro sürgünlerin boylarının uzatılması için en uygun konsantrasyon olan 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. BA konsantrasyonlarının mikro sürgün boyuna etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyici BA (mg/l)	Sürgün Boyu (mm)
0.0	17 b
0.1	15 b
0.5	28 a

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)

Bu araştırmada, kallustan elde edilen mikro sürgünlerin boylarının uzatılması ile ilgili yapılan denemelerde, sürgün boylarının uzatılması için BA konsantrasyonunun azaltılması gerektiği ortaya konmuştur. Durkovic (2006), yabancı kirazların boğum sürgünlerinden *in vitro* mikro çoğaltımı üzerine yürütmüş olduğu araştırmada düşük BAP konsantrasyonları (0.2-0.4 mg/dm³) ile 0.01 mg/dm³ IBA veya NAA kombinasyonunun sürgün boyunun uzamasını teşvik ettiğini belirlemiştir. Perez-Tornero ve ark. (2000) kayısında yaptıkları araştırmada sürgün boyunu uzatmak için düşük konsantrasyonda BAP (0.9 µM) ve IBA (0.2 µM) kombinasyonu kullanmışlardır.

Yukarıda belirtilen araştırma sonuçları yürütülmüş olan bu çalışmanın sonuç verilerini destekler nitelikte olup *in vitro* sürgünlerin köklendirme aşamasından önce boylarının uzatılabilmesi için araştırmada kullanılan sitokinin (BA) konsantrasyonunun azaltılması gerekliliği belirlenmiştir.

4.6. Mikro Sürgünlerin Köklendirilmesi

Araştırmanın bu aşamasında *in vitro* sürgünlerin köklendirilmesinde farklı düzeyde IBA'nın etkisi araştırılmış olup, *in vitro* sürgünler, 0.05-2.0 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırmada IBA'nın farklı düzeylerinin *in vitro* sürgünlerin köklenme oranları üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *In vitro* sürgünlerin köklendirilmesi

Bitki Büyüme Düzenleyici IBA (mg/l)	Köklenme oranı (%)	Kök Uzunluğu (mm)	Kök Sayısı (adet)
0.05	40.1 c	14.0 b	1.8 b
0.50	72.0 b	14.0 b	3.2 ab
1.00	84.2 a	22.0 a	4.7 a
2.00	36.2 d	12.0 b	1.4 b

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi, 1.0 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerdeki köklenme oranı %84.2, 0.5 mg/l IBA içeren besin

ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerdeki köklenme oranı ise %72.0 olarak saptanmıştır. IBA'nın en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarını içeren besin ortamlarında köklendirilen sürgünlerde köklenme oranı %36.2-40.1'e kadar düşmüştür. Araştırmada köklendirme ortamına ilave edilen 0.05, 0.50 ve 2.00 mg/l düzeylerindeki IBA'nın mikro sürgünlerin kök uzunluğu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmazken, 1.00 mg/l düzeyindeki IBA konsantrasyonunun kök uzunluğuna etkisi, diğer konsantrasyonların kök uzunluğuna etkileriyle karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Köklendirme ortamına ilave edilen 1.00 mg/l düzeyindeki IBA'nın mikro sürgünlerdeki kök sayısı üzerine etkisi istatistiksel açıdan diğer konsantrasyonların etkileriyle karşılaştırıldığında 0.05 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Başarılı bir sürgün rejenerasyon protokolünden söz edebilmek için elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılması şarttır. Dolayısıyla bu çalışmada *in vitro* sürgünlerinden oluşan kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenen sürgün sayıları birlikte değerlendirildiği zaman en uygun oksin konsantrasyonu 1.00 mg/l IBA düzeyi olarak belirlenmiştir.

Prunus cinsine ait çeşitlerin *in vitro* sürgünlerinin köklendirilmesinde genellikle MS besin ortamı ve farklı oksin konsantrasyonları kullanılmıştır. Antonopoulou ve ark. (2005)'nin GF-677 badem anacında yürüttükleri araştırmada *in vitro* sürgünler 1 mg/l IBA içeren besin ortamında kültüre alındıklarında %100 köklenme elde etmişlerdir. Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005), PR 204/84 şeftali badem melezinde yürüttükleri çalışmada farklı IBA konsantrasyonları içeren ½ MS veya MS besin ortamının *in vitro* sürgünlerdeki köklenme oranına etkilerini belirlemişlerdir. 1.0 mg/l IBA içeren MS kültür ortamında veya 0.5 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerde %100 köklenme elde edilmiştir. Durkovic (2006), yaptığı çalışmada kirazda boğum eksplantlarından elde ettiği *in vitro* sürgünleri 0.3 mg/dm³ IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alarak %73.3 köklenme elde etmiştir. Osterc ve ark. (2004)'nin kirazda yaptığı çalışmada *in vitro* sürgünler 1 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alındığında %75-100 köklenme oranı elde edilmiştir.

4.7. Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması

In vitro koşullarda elde edilen köklü bitkicikler dış koşullara alıştırılmak için içerisinde 3 farklı ortam bulunan plastik kaplara transfer edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. **A**; 1mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında köklendirilen *in vitro* sürgün, **B**; dış koşullara alıştırılmış *in vitro* GF-677 bitkisi. 3 haftalık bitki (sol), 8 haftalık bitki (sağ)

8. hafta sonunda bitkiciklerin canlılık oranları belirlenmiştir. 1:1 oranında torf:perlit içeren ortama transfer edilen bitkiciklerdeki canlılık oranı %66.4 bulunurken, yalnızca perlit içeren ortamdaki bitkiciklerin canlılık oranı %58.0, sadece torf içeren ortamdaki bitkiciklerin canlılık oranı %26.5 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması

Canlılık oranları (%)	Ortamlar		
	Perlit	Torf	Torf:Perlit (1:1)
	58.0 b	26.5 c	66.4 a

Aynı sütun üzerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05)

8. haftanın sonunda daha büyük saksılara aktarıldığında, torf:perlit içeren ortamda yetiştirilen bitkiciklerin adaptasyonu daha hızlı olmuş, bitkicikler kısa

sürede büyüme ve gelişmelerine devam etmiştir (Şekil 4.9). Sadece perlit ortamına transfer edilen bitkiciklerin yaprak renklerinde açılma gözlenmiştir.



Şekil 4.9. Torf:perlit (1:1) içeren ortama transfer edilerek iklim odasında büyütülen 12 haftalık bitkicikler

Torf ortamına aktarılan bitkiciklerin canlılık oranının düşük olmasının sebeplerinden birisi, köklerin dikim sırasında zararlanmış olabileceğindedir. Bundan dolayıdır ki dikim sırasında köklerin zararlanmasını önlemek için bitkiciklerin kökleri ortalama olarak 15 mm'yi geçmeden alıştırma ortamına aktarılmalıdır. Yine bu araştırma çıktısına paralel olarak Muna ve ark. (1999)'nın Maxma-14 kiraz çeşidinde yürüttükleri çalışmada bitkiciklerin köklendikten kısa bir süre sonra saksılara aktarıldığında, dış koşullara daha kolay alıştıkları vurgulanmıştır.

İn vitro çalışmalarda elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması aşamasında en önemli nokta su kaybını önlemektir. Perlit ortamına aktarılan bitkiciklerin canlılık oranlarındaki düşüklüğün başlıca sebebi olarak su ve besin maddesi yetersizliğinin olduğu varsayılmaktadır. *İn vitro* bitkicikler dış koşullara

alıŐtırılırken nem oranı yüksek olan iklim odalarında tutulup aŐamalı olarak nem oranının azaltılması da gerekmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemiz genelinde ve özellikle kireç kapsamı yüksek Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin topraklarına iyi adapte olmuş GF-677 hibrit anacının yaprak eksplantlarından ve kallustan adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmesi üzerine değişik BBD ve bunların konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

Araştırma kapsamında yapılan denemeler 7 ana başlık altında özetlenebilir:

1. Bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu,
2. Boğum eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması ve sürgün çoğaltımı,
3. Yaprak eksplantlarının kültüre alınması,
4. Sürgün diplerinde kallus oluşumunun teşvik edilmesi,
5. Mikro sürgünlerin boylarının uzamasının sağlanması,
6. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi,
7. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması.

Kültür başlangıç materyali olarak GF-677 hibrit anacının yeşil sürgünlerinin boğum eksplantları kullanılmıştır. Boğum eksplantlarının yüzeysel sterilizasyonu %8'lik NaOCl ile yapıldıktan sonra eksplantlar, 1 mg/l BA içeren MS besin ortamında 3 haftalık periyotlarla altkültüre alınarak, araştırma için gerekli olan *in vitro* sürgünler elde edilmiştir. *In vitro* sürgünlerin genç yaprakları adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla, değişik BBD ve bunların konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmış fakat sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Denemenin aşamaları

Denemenin Aşamaları	En iyi sonuçların alındığı kültür ortamları
1. Bitkisel materyalin yüzeysel sterilisasyonu	%70'lik etil alkol içinde 1 dk. daha sonra %8'lik NaOCl içerisinde 15 dakika bekletilmiştir.
2. Boğum eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması	30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar, 1 mg/l BA içeren MS
3.Yaprak eksplantlarının kültüre alınması	Yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır.
4. Sürgün diplerinde kallus oluşumunun teşvik edilmesi	30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar, 1 mg/l BA içeren MS
5. Mikro sürgünlerin boylarının uzamasının sağlanması	30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar, 0.5 mg/l BA içeren MS
6. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi	30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar, 1 mg/l IBA içeren ½ MS
7. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması	1:1 oranında perlit:torf karışımı

Sürgün diplerinde oluşan kallus dokusu sürgünden ayrılarak kültüre alındığında fenolik madde salgılamış ve eksplantlar kısa sürede kararmıştır. Fenolik bileşiklerin kesik yüzeylerden salgılandığı varsayılarak, sürgün diplerinde oluşan kalluslar kesilmeden sürgün ile birlikte 1 mg/l BA içeren MS ortamında altkültüre alındığında %63.4 oranında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Oluşan yeni sürgünlerin kalluslardan mı yoksa ana bitki kaynağına bağlı olarak gelişen adventif sürgünler mi olup olmadıklarının ortaya konması için yeni oluşan sürgünlerin kallusla bağlantı yerlerinden enine kesitler alınarak mikroskop altında incelenmesi gerekmektedir. Elde edilen sürgünler 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınarak boylarının uzaması sağlandıktan sonra 1 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alındığında %84.2 oranında köklenme elde edilmiştir. Köklü bitkicikler 1:1 oranında torf:perlit içeren ortama transfer edilerek dış koşullara alıştırıldığında bitkiciklerdeki canlılık oranı %66.4 olmuştur.

Bitki doku kültürü çalışmalarında başarı elde edebilmek için, eksplant seçimi, BBD konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesi, besin ortamlarının seçim çok önemlidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, her tür ve çeşidin doku kültürü tekniklerine gösterdiği tepkilerin farklı olduğu görülmüştür. Eksplantın yaşı, donör bitkinin fizyolojik durumu, eksplant kaynağı gibi faktörler rejenerasyon oranını etkilemektedir. Kültür besin ortamının türü, bileşenleri, optimum kültür şartları her bir genotip için farklılık göstermektedir.

Günümüze kadar *Prunus* spp. türlerine ait çeşitlerde birçok araştırma yapılmasına rağmen, bu çalışma GF-677 hibrit anacının yaprak eksplantlarından rejenerasyon elde edilmesine yönelik sınırlı sayıdaki çalışmalardan birisidir. Bu nedenle çalışmada karşılaşılan en büyük zorluk bu genotipe ait daha önce belirlenmiş bir rejenerasyon protokolu olmayışından dolayı, çalışmada BBD konsantrasyon ve kombinasyonlarını belirlemeye çalışırken, *in vitro* çalışmalarında önemli olan içsel ve dışsal etmenlerin herbirisi araştırılması gereken bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu çalışmasının tamamlanabilmesi için farklı ortamlar, ışık yoğunlukları, yaprak eksplantlarının alt veya üst yüzlerinin besin ortamına temas etmesi vb. faktörler denenebilir. *Prunus* cinsine ait türlerde yapılan bazı çalışmalarda yaprak eksplantlarından rejenerasyon elde edebilmek için yüksek konsantrasyonlarda BBD kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan BBD konsantrasyonları yayınlanmış bilimsel çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlara göre düşük kaldığı için sürgün rejenerasyonu elde edilememiş olabilir.

Diğer yandan bu çalışmada GF-677 hibrit anacının *in vitro* koşullarda kallustan sürgün rejenerasyonu için etkin bir protokol oluşturulmuştur. GF-677 hibrit anacı üzerinde biyoteknolojik çalışmaların yürütülmesi için gerekli olan ilk aşama sonuçlandırılarak bu anaçla ilgili olarak gelecekte yapılacak *in vitro* ve biyoteknolojik araştırmalar için yararlanılabilecek bir çalışma olabilecektir

KAYNAKLAR

- AĞAOĞLU, Y. S., ÇELİK, H., ÇELİK, M., FİDAN, Y., GÜLŞEN, Y., GÜNAY, A., HALLORAN, N., KÖKSAL, A. İ., ve YANMAZ, R., 1995. Genel Bahçe Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No:4, 369 s., Ankara.
- AINSLEY P. J., COLLINS G. G. and SEDGLEY, M., 2000. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explants of Almond (*Prunus dulcis* Mill.), *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant, 36(6): 470-474.
- AINSLEY, P. J., HAMMERSCHLAG, F. A., BERTOZZI, T., COLLINS, G. G. and SEDGLEY, M., 2001a. Regeneration of Almond from Immature Seed Cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 221-226.
- AINSLEY, P. J., COLLINS, G. G. and SEDGLEY, M., 2001b. *In Vitro* Rooting of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant, 37:778-785.
- ALMEHDI, A. A., and PARFITT, D. E., 1986. *In vitro* Propagation of Peach: 1. Propagation of ‘Lovell’ and ‘Nemaguard’ Peach Rootstocks. *Fruit Var. J.*, 40:12-17.
- ANDREU, P., and MARIN, J. A., 2005. *In vitro* Culture Establishment and Multiplication of The *Prunus* rootstock “Adesoto 101” (*P. institia* L.) as Affected by The Type of Propagation of the Donor Plant and by the Culture Medium Composition. *Scientia Horticulturae*, 106(2):258-267.
- ANTONOPOULOU, C., DIMASSI, K., THERIOS, I., CHATZISSAVVIDIS, C., and TSIRAKOĞLOU, V., 2005. Inhibitory Effects of Riboflavin (Vitamin B) on the *in vitro* Rooting and Nutrient Concentration of Explants of Peach Rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Scientia Horticulturae*, 106:268-272.
- BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ve ÖZCAN, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s., Konya.
- BHAGWAT, B., and LANE, D., 2004. *In vitro* Shoot Regeneration from Leaves of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) ‘Lapins’ and ‘Sweetheart’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78:173-181.
- BOURGIN, J. P., and NITSCH, J. P., 1967. Obtention de Nicotiana Haploides Partir d’tamines Cultives *in vitro*. *Annu. Physiol. Veg.*, 9:377-382.
- CHANNUNTAIPAT, C., SEDGLEY, M., and COLLINS, G., 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan x Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, 98:473-484.
- DRIVER, J. A., and KUNİYUKI, A. H., 1984. *In vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience*, 19:507-509.
- DURKOVIC, J., 2006. Rapid Micropropagation of Mature Wild Cherry. *Biologia Plantarum*, 50(4):733-736.
- ESCALETTES V., and DOSBA F., 1993. *In vitro* Adventitious Shoot Regeneration from Leaves of *Prunus* spp. *Plant Science*, 90(2):201-209.

- ESPINOSA, A. C., PIJUT, P. M., and MICHLER, C. H., (2006). Adventitious Shoot Regeneration and Rooting of *Prunus serotina* *in vitro* Cultures. Hortscience, 41(1):193-201.
- FOTOPOULOS, S., and SOTIROPOULOS, T. E., 2004. *In Vitro* Propagation of The Peach Rootstock: The Effect of Different Carbon Sources and Types of Sealing Material on Rooting. Biologia Plantarum, 48(4):629-631.
- FOTOPOULOS, S., and SOTIROPOULOS, T. E., 2005. *In Vitro* Rooting of 204/84 Rootstock (*Prunus 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.
- GENTILE, A., MONTICELLI, C., and DAMIANO, C., 2002. Adventif Shoot Regeneration in Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Plant Cell Rep., 20: 1011-1016.
- GÖNÜLŞEN, N., 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, No:78, 40 s., İzmir.
- GÜR, İ., 2003. GF-677 Anacı. Eğirdir Bahçe, Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Online Tarımsal Bilgi-Magazin Dergisi, Sayı:3, Ekim.
- GÜREL, S., ve 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.
- 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.
- HAMMATT, N., and GRANT, N. J., 1998. Shoot Regeneration from Leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). Plant Cell Report, 17:526-530.
- JAIN, N., and BABBAR, S. B., 2000. Recurrent Production of Plants of Black Plum *Syzygium cuminii* (L.) Skeels, a Myrtaceous Fruit Tree, From *In Vitro* Cultured Seedling Explants. Plant Cell Reports, 19:519-524.
- JAIN, N., and BABBAR, S. B., 2003. Regeneration of "Juvenile" Plants of Black Plum, *Syzygium cuminii* Skeels, From Nodal Exp of Mature Trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73:257-263.
- KAMALI, K., MAJIDI, 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.
- KNOB, W., 1865. Quantitative Untersuchung Uber Die Ernährungsprozesse Der Pflanzen. Landwirtsch Vers Stn., 30:292-294.
- LINSMAIER, E. M., SKOOG, F., 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., 18:100-127.
- LITZ, R. E., and GRAY, D. J., 1992. Organogenesis and Somatic embryogenesis. In: Hammerslag FH, Litz RE (eds) Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB Int, Wallingford, p. 3-34.

- LLOYD, G., and MCCOWN, L. B., 1981. Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot Culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 30:421-427.
- MATT, A., and JEHLE, J. A., 2005. *In vitro* Plant Regeneration From Leaves and Internode Sections of Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.) Plant Cell Rep., 24: 468-476.
- MIGUEL, C. M., DRUART, P. H., and OLIVEIRA, M. M., 1996. Shoot Regeneration from Adventitious Buds Induced on Juvenile and Adult Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Explants. *In vitro* Cell Dev Biol Plant, 32:148-153.
- MUNA, A., AHMAD, A., MAHMOUD, K., and ABDUL-RAHMAN, K., 1999. *In Vitro* Propagation of Semi-dwarfing Cherry Rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59:203-208.
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- OSTERC, G., LUTHAR, Z., and STAMPAR, F., 2004. The Importance of the Sterilization Procedure for Producing Vigorous Cherry Plants (*Prunus* sp.) *In Vitro*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83:45-51.
- PASCUAL, L., and MARIN, J. A., 2005. A Liquid 2,4-D Pulse Increased Shoot and Root Regeneration from Leaf Explant of Adult *Prunus* Rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 106:582-592.
- PEREZ-TORNERO, O., EGEA, J., VANOOSTENDE, A., and BURGOS, L., 2000. Assessment of Factors Affecting Adventitious Shoot Regeneration From *in vitro* Cultured Leaves of Apricot. *Plant Science*, 158: 61-70.
- PRUSKI, K., ASTATKIE, T., and NOWAK, J., 2005. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking Cherry (*Prunus tomentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82:207-211.
- QUOIRIN, M., and LEPOIVRE, P., 1977. Etude de Milieux Adaptes Aux Cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.*, 78:437-442.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P., and BOXUS, P., 1977. Un Premier Bilan de 10 Annees de Recherches Sur Les Cultures de Meristemes et la Multiplication *in vitro* de Fruitiers Ligneux. C.R. Rech. Stn. Cult. Fruit. Maraicheres Gembloux, 93-117.
- ROM, R. C., and CARLSON, R. F., 1978. Rootstocks for Fruit Crops. A Wiley-Interscience Publication, 494 p. USA.
- RUGINI, E., JACOBONI, A., and LUPPINO, M., 1993. Role of Basal Shoot Darkening and Exogenous Putrescine Treatments on *In Vitro* Rooting and an Endogenous Polyamine Changes in Difficult-to-root Woody Species. *Scientia Horticulturae*, 53:63-72.
- TANG, H., REN, Z., REUSTLE, G., and KRCZAL, G., 2002. Plant Regeneration from Leaves of Sweet and Sour Cherry Cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93:235-244.
- VASAR, V., 2004. Application of Antioxidants in Rooting of *Prunus avium* L. Microshoots. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676:251-256.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Ankara'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne girdi, 1996'da mezun oldu. 1998-2003 yılları arasında eşinin öğrenimi dolayısıyla ABD'de kaldı. Şubat 2005'te Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizce olup, evli ve 2 çocuk annesidir.

ÖZET

Bu araştırma, 2006-2007 yılları arasında HR.Ü. Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu çalışma ile, bademe anaç olarak kullanılan GF-677'nin *in vitro* rejenerasyonunu mümkün kılacak tam bir protokol oluşturulmuştur. Aktif büyüme döneminde olan 2 yaşındaki ağaçlardan o yılın sürgünleri alınarak yaprakları temizlenmiştir. Birer boğumdan oluşan dal parçaları %70'lik etanol içinde 1 dk. tutulduktan sonra %8'lik ticari çamaşır suyuyla 15 dakika sterilize edilip, 5'er dakika süreyle steril saf su ile 4 kez durulanmıştır. Hazırlanan besin ortamı, pH'ı 5.6'ya ayarlandıktan sonra 121⁰C'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyonu tamamlanan boğum eksplantları, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

Boğum eksplantlarının sürmesi ve kardeşlenmesi bakımından en iyi sonuç 1.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında alınmıştır. 0.5 veya 2.0 mg/l BA içeren besin ortamlarında kültüre alınan boğum eksplantlarındaki sürme 7-10 gün gecikmiştir.

In vitro'da elde edilen sürgünlerin tam açılmış genç yaprakları alınarak üzerlerinde kesikler yapıldıktan sonra 30 ml MS besin ortamı içeren 9 cm çapındaki petri kutularına (üst yüzleri besin ortamına temas edecek şekilde) yerleştirilmiştir. MS besin ortamına TDZ ve BA tek başına yada NAA ile kombinasyon halinde ilave edilmiştir. 3 hafta karanlık ortamda kültüre alınan eksplantlar daha sonra 16 saat fotoperiyota tabii tutularak 3 haftada bir taze ortamda altkültüre alınmıştır. 3 hafta karanlık ortamda kültüre alınan yaprak eksplantlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. 4 kez altkültüre alınan yaprak eksplantlarında sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

1 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin dibinde beyaz yoğun bir kallus dokusu oluşmuş ve bu kallus dokusundan adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Rejenere olan sürgünler ayrılarak 0.0, 0.1 veya 0.5

mg/l BA, 30 g/l sukroz, 5.5 g/l agar içeren sürgün uzatma ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi sonuç 0.5 mg/l BA içeren besin ortamında alınmıştır.

Uzatılan *in vitro* sürgünler köklendirilmek için 0.05, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamına aktarılmıştır. 1.0 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamındaki sürgünlerin %84.2'si köklenmiştir. Köklenen bitkicikler başarı ile dış koşullara alıştırılarak %66.4 oranında canlı bitki elde edilmiştir.

SUMMARY

This research was carried out in Biotechnology laboratory of HR.U. Faculty of Agriculture during 2006-2007. In this research, a complete regeneration protocol was developed for GF-677, an important rootstock for almond and peach. Nodal sections (2 cm in length) of softwood cuttings from actively growing 2-year old trees were excised and surface disinfected in 70% (v/v) ethanol for 1 min., then in 8% (v/v) commercial bleach (0.525 NaOCl) for 15 min., followed by four rinses (5 min. each) in sterile, dH₂O.

Following sterilization, nodal explants were cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1.0 or 2.0 mg/l of BA. The highest rate of adventitious shoot initiation and multiplication was recorded at concentration of 1 mg/l BA. Higher or lower concentrations of BA than 1 mg/l delayed the time of shoot initiation for 7 to 10 days.

The young expanding leaf explants from *in vitro* shoots were excised, wounded and firmly placed abaxial side up in 9 cm diameter petri dishes containing 30 ml MS medium supplemented with TDZ or BA alone, or in combination with NAA. Explants cultured for 3 weeks in the dark and then transferred to a 16-8 hour (light-dark) photoperiod. Callus formation has occurred on the leaf explants within 3 weeks in the dark. The explants were subcultured to the fresh media at 3-week intervals. After 4 subcultures, no regeneration was observed on the calli derived from the leaf explants.

Callus formation was induced at the bases of shoots on MS medium supplemented with 1 mg/l BA and the adventitious shoots differentiated from these calli. Regenerated shoots from calli were scored, excised, and transferred to elongation medium supplemented with 0.0, 0.1, or 0.5 mg/l BA. MS medium

Supplemented with 0.5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, and 5.5 g/l agar provided the best shoot elongation.

Elongated shoots were cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 0.05, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/l IBA for rooting. On $\frac{1}{2}$ MS medium containing 1.0 mg/l IBA, a maximum rooting efficiency of up to 84.2% was obtained. Rooted plantlets were successfully acclimatized and transferred to potting mix with 66.4% survival.