

**ASMADA FARKLI EKSPANTLARIN *IN*  
*VITRO* REJENERASYONLARI ÜZERİNE BİR  
ARAŞTIRMA**

**Zehra BABALIK**

**Yüksek Lisans Tezi  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA, 2006**

**T. C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASMADA FARKLI EKSPANTLARIN *IN VITRO***  
**REJENERASYONLARI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**Zehra BABALIK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ISPARTA-2006**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	13
3.1. Materyal .....	13
3.2. Yöntem .....	13
3.2.1. Eksplantların Hazırlanması .....	13
3.2.2. Eksplantların Dezenfeksiyonu .....	14
3.2.3. Sürgün Ucu Kaynağı ve <i>In Vitro</i> Bitkiciklerin Yetiştirilmesi .....	14
3.2.4. <i>In Vitro</i> Sürgünlerin Çoğaltılması .....	14
3.2.5. <i>In Vitro</i> Sürgünlerin Köklendirilmesi .....	15
3.2.6. <i>In Vitro</i> Bitkiciklerden Eksplantların Hazırlanması .....	16
3.2.7. Eksplantların Dikildiği Besin Ortamları .....	16
3.2.8. Kültür Koşulları .....	17
3.2.9. İncelenen Özellikler .....	17
3.2.10. Kallusların Kültüre Alınması .....	20
4. BULGULAR .....	23
4.1. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular .....	23
4.2. Gövde Eksplantından Elde Edilen Bulgular .....	27
4.3. Yaprak Ayası Eksplantlarından Elde Edilen Bulgular .....	31
4.4. Eksplant Tipinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri .....	38
4.5. Yaprak Ayası Eksplantlarında Farklı Kesim Şekillerinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri .....	39
4.6. Besin Ortamlarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri .....	40
4.7. Kültür koşullarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri .....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	44
6. KAYNAKLAR .....	50
ÖZGEÇMİŞ .....	54

**ÖZET****ASMADA FARKLI EKSPLANTLARIN IN VITRO REJNERASYONLARI  
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Bu araştırmada bitkisel materyal olarak Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden alınan yaprak sapı, yaprak ayası ve gövde parçacıklarının *in vitro* rejenerasyonları üzerine eksplant tipi, yaprak ayalarının kesim şekilleri, besin ortamları ile ışıklandırma süresinin etkileri incelenmiştir.

Eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D, zeatin, kazein hidrolizat ve ABA içeren MS ve NN ortamlarına dikildikten sonra aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Araştırma sonucunda kallus oluşturan eksplant oranı, A tipi kallus oluşum oranı ve adventif sürgün oluşumu eksplant tipine, yaprak ayalarına uygulanan kesim şekillerine, besin ortamlarına ve ışıklandırma süresine göre değişmiştir. Buna göre gövde eksplantları A tipi kallus ve adventif sürgün gelişimi bakımından en iyi sonuçları verirken; ortamlar içinde A tipi kallusların da en fazla 2 mg/l zeatin katkılı NN 2 ortamından, adventif sürgün gelişimi de 2 mg/l zeatin içeren MS 2 ve 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat içeren MS 9 ortamlarından elde edildiği belirlenmiştir. Yaprak ayalarına uygulanan kesim şekillerinden bisturi ile çizilmiş yaprak ayası kallus oluşum oranı ve A tipi kallus oluşum oranı bakımından cork borer ile kesilenlere göre daha başarılı sonuçlar verirken; adventif sürgün gelişimi her iki uygulamada da elde edilememiştir. Karanlık koşullar ise kallus oluşumu ve indirekt adventif sürgün oluşumu üzerinde olumlu etkiler de bulunurken; 16/8 h ışıklandırma ise A tipi kallus ve direkt adventif sürgün gelişimini artırdığı tespit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Asma (*Vitis vinifera* L.), eksplan tipi, besin ortamı, kültür koşulları, *in vitro* rejenerasyon

**ABSTRACT****A RESEARCH ON *IN VITRO* REGENERATION OF DIFFERENT EXPLANTS IN GRAPEVINES**

In this study, the effects of explant type, cutting shape of lamina, nutrient media and culture conditions on *in vitro* regeneration of petiole, lamina and stem explants taken from *in vitro* plants of Kalecik karası were investigated.

The explants were planted on MS and NN medium supplemented with different concentrations of BAP, 2,4-D, zeatin, casein hydrolysisate and ABA and then they were cultured in dark or light conditions. As a result of this research, formation of callus, A type of callus and adventitious shoot formation were obtained in different ratio according to explant type, cutting shape of lamina, nutrient media and culture conditions. Stem explants gave the best results for the A type of callus and adventitious shoot formation. While A type of callus were obtained on medium NN 2 containing 2 mg/l zeatin, the highest adventitious shoot formation were obtained on MS 2 medium containing 2 mg/l zeatin and MS 9 medium containing 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l casein hydrolysisate. Leaf disks cut with a scalpel was found more successful than leaf excised with a cork borer for the formation of callus and A type of callus. However adventitious shoot formation could not obtained from the lamina cut not only cork borer but also the scalpel. Dark condition was showed positive effect on formation of callus and indirect adventitious shoot formation. On the other hand, 16/8 h light regime increased A type of callus and direct adventitious shoot formation.

**KEY WORDS:** Grapevine, explant type, nutrient media, culture conditions, *in vitro* regeneration

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışmaya beni yönlendiren, çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli ortamın hazırlanmasında, sonuca ulaşmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmayı mali yönden destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Müdürlüğüne, araştırma materyalinin temin edildiği Akara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne, ayrıca çalışmalarım sırasında benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Uzm. Sema ÇETİN'e ve Arş. Gör. Filiz HALLAÇ TÜRK'e teşekkür ederim.

Bugüne kadar maddi ve manevi yönden destek sağlayan ve varlıkları ile hep yanımda olan fedakar aileme ve eşim Alper BABALIK'a sonsuz sevgi ve saygılarımla...

**Zehra BABALIK**

**Isparta, 2006**

**SİMGELER DİZİNİ**

<b>ABA</b>	Abcisic acid
<b>BAP</b>	6-benzylaminopurine
<b>2,4-D</b>	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
<b>MS</b>	Murashige ve Skoog (1962) ortamı
<b>NN</b>	Nitsch ve Nitsch (1969) ortamı
<b>ZEA</b>	Zeatin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.2.4.1. İklim odasının genel görünüşü.....	15
Şekil 3.2.5.1. Eksplant kaynağı olarak kullanılan Kalecik karasına ait <i>in vitro</i> bitki.....	16
Şekil 3.2.8.1. Kùltürlerin iklim odasındaki genel görünüşleri.....	17
Şekil 3.2.9.1. Direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu.....	18
Şekil 3.2.9.2. Adventif sürgünlerden tam bitkiye dönüşümü sağlanmış bitki .....	18
Şekil 3.2.9.3. Eksplantlardan elde edilen A tipi kallus.....	19
Şekil 3.2.9.4. Eksplantlardan elde edilen B tipi kallus.....	19
Şekil 4.3.1. Yaprak ayalarına uygulanan farklı kesim şekilleri.....	31
Şekil 4.4.1. Eksplant tipinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri.....	38
Şekil 4.5.1. Yaprak ayası eksplantında farklı kesim şekillerinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.6.1. MS besin ortamlarının kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşumu ve adventif sürgün oluşum oranı üzerine etkileri.....	40
Şekil 4.6.2. Kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşumu ve adventif sürgün oluşumunun NN besin ortamlarına göre değişimi.....	41
Şekil 4.7.1. Işıklanma rejimlerinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşumu ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri.....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1.1. Denemede kullanılan Kalecik karası üzüm çeşidine ait bazı özellikler.....	13
Çizelge 3.2.7.1. MS temel besin ortamının bileşimi.....	21
Çizelge 3.2.7.2. NN temel besin ortamının bileşimi.....	21
Çizelge 3.2.7.3. Eksplantların dikildiği besin ortamları.....	22
Çizelge 4.1.1. Yaprak sapı eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	25
Çizelge 4.1.2. Yaprak sapı eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	26
Çizelge 4.2.1. Gövde eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	29
Çizelge 4.2.2. Gövde eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	30
Çizelge 4.3.1. Bisturi ile çiziler açılmış yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	33
Çizelge 4.3.2. Bisturi ile çiziler açılmış yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	34
Çizelge 4.3.3. Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	36
Çizelge 4.3.4. Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	37

## 1. GİRİŞ

Günümüzde biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanıklı, verim ve kalitesi yüksek üzüm çeşitlerine olan talepler gün geçtikçe artmakta, bu da araştırmacıları yeni çeşitler elde etmeye ya da var olan çeşitlere bazı özellikler kazandırmaya yönelik ıslah çalışmalarına yöneltmektedir.

Asmada ıslah çalışmaları diğer bitki türlerinde olduğu gibi başta klon seleksiyonu ve melezleme ıslahı olmak üzere klasik yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak klon seleksiyonu ile istenilen özellikleri kombine eden tek bir bireyin elde edilmesindeki olanaksızlıklar, melezleme ıslahında ise yüksek heterozigot kalıtsal yapı, uzun generasyon süresi, uygun genetik özelliklere sahip melezlerin seçiminin uzun zaman alması, bağlı genler nedeniyle istenmeyen bazı özelliklerin döllere geçmesi ve melezleme depresyonu nedeniyle kendilemenin engellenmesi gibi bir takım dezavantajları ile son derece uzun bir süreci gerektirmektedir. Bütün bu olumsuzluklar, özellikle son yıllarda, kısa sürede kesin sonuçlar sunan moleküler ve hücre tekniklerinin kullanıldığı ıslah metotlarının geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yeni ıslah metotları, sadece yeni bir çeşidin geliştirilmesine olanak sağlamamakta; ayrıca, bir çeşidin temel niteliklerini bozmadan istenilen spesifik bir karakterin kazandırılmasına ilişkin modifikasyonlara da imkan sağlamaktadır. Ancak moleküler genetik metotlarının ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanabilmesi, her şeyden önce, bu yöntemlerde ıslah materyali olarak kullanılan bitki parçacıklarının (eksplant) *in vitro* koşullarda tam bitkiye dönüşümlerinin sağlanması ile mümkün olabilmektedir.

Asmada eksplant kaynağı olarak; sürgün ucu (Thomas, 2000; Matsumoto ve Sakai, 2003) anter (Nakajima ve Matsuta 2003; Kikkert ve ark., 2005), ovul (Emershad ve Ramming, 1994), meristem (Göktürk Baydar, 1997), sülük (Salunkhe ve ark. 1997), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış zigotik embriyo (Gök Tangolar, 2002) gibi birçok bitki kısmı değişik amaçlara yönelik olarak başarıyla kullanılabilir. Bu eksplantlar dışında yaprak ayası ve sapı (Nakano ve ark., 1997; Zhu ve ark., 1997; Jayasankar ve ark., 1999) ile boğum arası parçacıkları (Thomas, 2001) da doku

kültürü çalışmalarında yoğun olarak kullanılan eksplantlar olup, *in vitro* rejenerasyonda özellikle ıslah çalışmaları için son derece değerli materyaller olan kallus, adventif tomurcuk ya da somatik embriyo oluşturma potansiyeline sahip olan eksplantlardır.

Bitki biyoteknolojisinde kullanılan kallus kültürü; *in vitro* çoğaltma, hücre bölünmeleri sırasında ortaya çıkan somaklonal varyasyonlardan yararlanma, sekonder metabolitlerin elde edilmesi ve hücre kültürlerinin oluşturulması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. *In vitro*'da bitki rejenerasyon tekniklerinden bir diğeri de adventif organ oluşumu yani organogenesis'tir. Organogenesis, hücre ve dokulardan yeni bireyler meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Somatik embriyogenesis bitki rejenerasyonunda kullanılan tekniklerden birisi olup, haploid ya da diploid yapıdaki somatik hücre ve dokulardan belirli embriyogenik aşamalar sonucunda meydana gelen embriyo oluşumu olarak tanımlanmaktadır (William ve Maheswaran, 1986).

Kısaca yaprak ayası, yaprak sapı ve gövde parçacıklarının *in vitro* koşullarda rejenerasyonları sonucunda meydana gelen kallus, adventif sürgün ve/veya somatik embriyolar gen transferi ve somaklonal varyasyon çalışmaları için son derece uygun yapılar olup, bunların tam bitkiye dönüşümlerinin sağlanması da bu ıslah çalışmalarının başarısını doğrudan etkilemektedir.

Bitkisel materyal olarak Kalecik karası üzüm çeşidine ait yaprak sapı, yaprak ayası ve gövde parçacıklarının kullanıldığı bu araştırmada, bu eksplantların *in vitro* rejenerasyonları üzerine eksplant tipi, besin ortamı, yaprak ayalarının kesim şekilleri ile ışıklandırma süresinin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

Asmada yaprak sapı, yaprak ayası ve gövde eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonlarını sağlamak amacıyla değişik asma tür ve çeşitlerinde araştırmalar yapılmış olup, bu çalışmalarda başarı oranını artırmak amacıyla eksplantın alındığı bitkinin kaynağı, uygulanan kültür koşulları ve kullanılan besin ortamlarının tip ve konsantrasyonu gibi faktörlerin etkileri incelenmiştir. Bu araştırmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Bazı asma genotiplerinin boğum arası eksplantlarını kullanarak organogenesis yoluyla bitki elde eden Rajasekaran ve Mullins (1981), araştırmalarında, kullandıkları ortam ve genotiplerin büyük bir kısmında adventif kök oluşumunu gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Adventif göz oluşumunun ise 1  $\mu$ M BA ve 5  $\mu$ M 2,4-D; 1  $\mu$ M BA ve 5  $\mu$ M NOA; 1  $\mu$ M BA + 5  $\mu$ M 2,4-D + 5  $\mu$ M NOA içeren sıvı NN ortamında kültüre alınan eksplantlarda meydana geldiği bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca, ana bitki ve genotipin olgunluğu, eksplant orijini ve ortam kompozisyonunun etkileri de araştırılmıştır.

Stamp ve Meredith (1988) ise yaptıkları çalışmalarında Cabernet Sauvignon'un hem *in vitro* da hem de serada yetiştirilen ve *V. rupestris* 'St. George' ve PI 200692'nin serada yetiştirilen 5 mm'den daha küçük yapraklarını NN ve MS temel besin ortamlarında kültüre aldıklarında somatik embriyoları elde etmişlerdir. Büyüme düzenleyici madde kombinasyonlarının somatik embriyogenesis oluşumunu etkilediğini bildiren araştırmacılar, ayrıca genotipin, eksplant tipi ve kaynağının, kültür yönteminin, kültür ortamının bileşiminin ve donör bitkinin durumunun embriyo oluşumunu etkilediğini belirtmişlerdir.

Matsuta ve Hirabayashi (1989), *Vitis vinifera* cv. Koshusanjaku çeşidine ait yapraklardan elde ettikleri embriyogenik kallusları 1.0  $\mu$ M 2,4-D içeren ve içerisinde vitamin, inositol ve glisin bulunmayan NN ortamında kültüre almışlardır. Bu kallusların yaklaşık olarak 2 yıl aynı ortama alt kültüre alınmasıyla yüksek embriyogenik yeteneklerini yitirmediklerini ve hormonsuz ortama transfer

edildiklerinde fazla miktarda embriyo ürettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada yaprak kalluslarından elde ettikleri somatik embriyogenesisi teşvik etmek amacıyla sitokinin'lerin etkilerini de incelemişlerdir. Bu amaçla BA (6-benzylamino), KIN (kinetin), ZEA, 2İP ((2-isopentenyl) adenine), KT-30 (CPPU) (N-(2-chloro-4-pyridily)-N'-phenylurea) ve TAG (TDZ) (N-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-N'-phenylurea) sitokininleri denenmiştir. Sentetik sitokininlerden KT-30 ve TAG somatik embriyogenesisin teşvikinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu sitokininlerin hem 5.0 hem de 10.0 µM 2,4-D ile kombine edilmesi halinde meydana gelen yaprak kallusları somatik embriyolar üretilebilmiştir.

*Vitis labrusca* Catawba çeşidinin *in vitro*'da yetiştirilen sürgünlerinden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından sürgün rejenerasyonunu ve normal bitkileri elde eden Cheng ve Reisch (1989), rejenerasyonun hem BAP hem de IAA (Indol asetik asit)'in varlığında meydana geldiğini, ancak 2,4-D veya NAA (Naftelin asetik asit)'in BAP ile kombinasyonunda yaprak eksplantlarından rejenerasyon sağlanamadığını belirtmişlerdir. %15'in üzerinde yaprak ve %70'in üzerinde yaprak sapı 5-10 µM BAP ve 0.1-0.5 µM IBA (Indol butirik asit) içeren ortam üzerinde rejenerasyon olabilmektedir. Yaklaşık olarak sürgünlerin %50'si ışıklı ortama aktarıldıklarında normal bir gelişme göstermişlerdir. Yaprak saplarında ve yapraklarda rejenerasyon her zaman alt uçta gerçekleşmiştir.

Clog ve ark. (1990) çalışmalarında bazı asma anaçlarının yaprak dokularından organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir. Büyüme çemberinde yetiştirilen olgun bitkilerden ve *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan yapraklar bisturi ile yaralanmış ve BA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Sonuç olarak sürgün oluşumu için BA'ye mutlaka ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Rejenerasyon için en uygun parametrelerin eksplant kaynağının yaşı, kültür ortamının bileşimi ve kültür ortamının sıcaklığı olduğu tespit edilmiştir.

Stamp ve ark. (1990a) çalışmalarında 2 mg/l BA içeren katı NN ortamında kültüre alınan *V. vinifera* çeşitleri olan French Colombard ve Thompson Seedless'in boğum

kültürlerinden elde edilen sürgünlerden alınan yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarından 3 hafta içinde adventif sürgünlerin geliştiğini belirtmişlerdir.

Araştırmalarında adventif sürgünleri *Vitis vinifera* çeşitleri olan Cabernet Sauvignon, French Colombard, Grenache, Thompson Seedless ve White Riesling, *Vitis rupestris* çeşidi olan St. George ve *V. vinifera* x *V. rupestris* çeşidi olan Ganzin 1'in *in vitro*'da büyüyen yapraklarından elde ettiklerini belirten Stamp ve ark. (1990b), 15 mm'den daha küçük olan yaprak eksplantlarını boğum kültürlerinden elde etmişler ve 0, 1, 2 ve 4 mg/l BAP içeren MS veya NN temel rejenerasyon ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar adventif sürgünlerin 4 hafta içerisinde yaprak sapından ve nadiren de yaralanmış yaprak ayasından geliştiğini gözlemlemişlerdir. Sürgün organogenesis'inin sadece BAP içeren ortamda ve özellikle de 1 ve 4 mg/l BAP'a göre 2 mg/l BAP da daha yüksek oranda meydana geldiğini saptamışlardır. 2 mg/l BAP içeren ortamda, yaprak eksplantlarından adventif sürgün oluşumunun çeşitlere göre farklı oranlarda olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, katı kültür ortamının, sıvı kültür ortamına göre daha iyi sonuç verdiğini ve katı ortama transfer sıklığının rejenerasyon oranını etkilemediğini bildirmişlerdir. Eksplantların %80'den fazlası başlangıçta adventif gözler oluşturmuş ve daha sonra da sürgün büyümesinin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Her bir eksplanttan yaklaşık olarak 6 sürgün meydana geldiğini, bu sürgünlerin kolaylıkla köklendirilebildiğini ve morfolojik olarak ana bitkiye benzediklerini bildirmişlerdir.

Colby ve ark. (1992), French Colombard çeşidinin *in vitro*'da kültüre alınan yaprak saplarından direk sürgün oluşumunun anatomisini incelemişlerdir. Rejenere olan yaprak sapı parçaları 2-3 gün arayla uzunluğuna kesilmiş ve fikse edilmiştir. Rejenerasyon ortamında 3 günlük iken, yeni hücre bölünmeleri belirleyen araştırmacılar, 6 gün sonra meristematik aktivitenin 3 farklı bölgesi yaprak sapı parçasının genişleyen kısmında, yaraya tepkiyi, organogenik ve vasküler bölgelerde görmüşlerdir.

Goebel Tourand ve ark. (1993) asmada somatik embriyo gelişimindeki problemlerin nedenlerini anlamak amacıyla, bitkiye dönüşüm yeteneklerinin farklı olduğu bilinen

CH 76 ve 41 B kullanılarak histolojik çalışmalar yapmışlardır. Araştırmacılar, CH 76'nın % 70 lik yüksek bitkiye dönüşüm oranına, iyi gelişmiş ve iplik şekilli kotiledonlar arasında fonksiyonel sürgün uçlarına sahip olduğunu belirlerken, 41 B'nin normal kök apeksine sahip, fakat bitkiye dönüşüm oranının düşük (%10), sürgün uçlarının iyi gelişmemiş anormal şekilli olduğunu tespit etmişlerdir. Bu anormal oluşum kontrolsüz hücre çoğalması, adventif tomurcuk oluşumu, kotiledon ya da yaprak meristemini fazla gelişmesi gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir. ABA, 41 B embriyolarının tam bitkiye dönüşüm oranını %10'dan %20'ye yükseltmiş fakat embriyo morfolojisini geliştirmede başarısız bulunmuştur. Zeatin ve BAP ise gelişmeyi teşvik etmiş fakat anormal oluşum oranını artırmış, bitkiye dönüşüm oranını artırmada ise etkisiz bulunmuştur. ABA ile kombine uygulamalar ise kotiledonlu embriyo oluşum oranını artırmış fakat tam bitkiye dönüşüm oranını azaltmıştır.

*Vitis rupestris*'in yaprak ve yaprak sapından elde edilen kallusları BA ve 2,4-D'nin (1+0.1 mg/l ve 1+1 mg/l) iki farklı kombinasyonu ile MS ortamında kültüre alan Martinelli ve ark. (1993) bunlardan sırasıyla %3.2 ve %4.2 oranında somatik embriyo oluştuğunu belirtmişlerdir. Somatik embriyolardan embriyogenik kallus, embriyo alt kültürleri ve somatik embriyogenesis MS veya NN ortamlarına hem 1 mg/l IAA, hem de 0.1 mg/l IBA eklendiğinde elde edilmiştir. 4 aylık bir kültürde, 1 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA + 250 mg/l kazein hidrolizat içeren NN ortamında 2 hafta +4°C'de soğuklatıldıktan sonra aktarılan embriyolarda %13 oranında embriyo çimlenmesi meydana gelmiştir. En yüksek çimlenme oranı %51 ile 9 aylık uzun kültür sonucunda soğuklamanın olmadığı sadece IBA içeren ortamda elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Seyval blanc üzüm çeşidinin *in vitro* bitkiciklerinden alınan yaprak eksplantları için etkili bir rejenerasyon yöntemi belirleyen Harst (1995) yüksek oranda somatik embriyo oluşumunun 20 µM NOA (Naftoksi asetik asit) + 4 µM TDZ içeren modifiye NN ortamında sağlandığını belirtmiştir. 2.5 mM fenilalenin uygulanması embriyo oluşumunu oluşum periyodunu azaltarak ve rejenerasyon oranını artırarak teşvik etmiştir. Dikilen yaprak eksplantlarının yaklaşık olarak %80'inde embriyolar

oluşmuş ve bunların, rejenerasyon kapasiteleri en az 2 yıl sürdürebildiklerini belirtmiştir.

Torregrosa ve ark. (1995) çalışmalarında bitki materyali olarak VRH 8715 (*Vitis vinifera* (Ugni blanc x Cabernet Sauvignon) x *Muscadinia rotundifolia* cv. Carlos), VRH 8773 (*V. vinifera* (Cabernet Sauvignon x Alicante Bouschet) x *M. rotundifolia* cv. NC 184-4) ve VMH 1 (VRH 8773 x 140 Ru (*V. berlandieri* x *V. rupestris*))'in boğum kültürlerinden alınan 0.5-4 mm büyüklüğündeki yaprak eksplantlarını kullanmışlardır. Kallus oluşumunu ve proliferasyonunu sağlamak amacıyla 6 g/l agar + 25 g/l sakkaroz içeren yarım kuvvetteki MS ortamını kullanmışlar ve büyüme düzenleyicilerinin en iyi kombinasyonunu belirlemek amacıyla NOA, 2,4-D ve 2,4,5-T (2,4,5-trichloropphenoxyacetic acid) (5 ve 10  $\mu\text{M}$ )'yi BAP (1,1 ve 2,2  $\mu\text{M}$ ) ile kombine etmişlerdir. Sonuç olarak NOA'nın herhangi bir organogenik veya embriyogenik yetenek göstermediğini, 2,4,5-T'nin fitotoksik etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ortama ilave edilen 5  $\mu\text{M}$  2,4-D'nin iyi yapıda kallus oluşturduğunu ancak 10  $\mu\text{M}$ 'ün ise kallus oluşumunu arttırmadığı aksine kahverengileşmeye neden olarak embriyogenesisin azalmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Aktif olarak çoğalan bütün embriyogenik kalluslar, 5  $\mu\text{M}$  IAA ve 1.1  $\mu\text{M}$  BA eklenmiş ortama transfer edildiği zaman çok yüksek oranda bitki oluştuğu gözlenmiştir. Bu ortam üzerindeki, globular embriyolar seçilerek 1.1  $\mu\text{M}$  BA içeren ortama yerleştirildiğinde beyaz, iyi şekillenmiş embriyoların geliştiği saptanmıştır. Embriyolar çimlenmeyi takiben, hormonsuz ortam bulunan kültür tüplerine aktarıldıklarında %95 oranında normal bitki oluşturduklarını belirtmişlerdir.

Perl ve ark (1995) yaptıkları çalışmalarında, asmada genetik transformasyon sistemlerinin geliştirilmesi için, bir farklılaşma aşamasından diğer farklılaşma aşamasına geçmede rejenerasyon protokolünün çok önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Compton ve Gray (1996) çalışmalarında *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless çeşidinde somatik embriyogenesis üzerine sakkarozun ve methylglyoxal bis-(guanylhidrazone) (MGBG)'in etkilerini belirlemek amacıyla somatik embriyoları ve embriyogenik hücreleri 60, 90, 120, 150 ve 180 g/l sakkaroz ve 0, 0.1, 1 ve 10 mM

MGBG içeren embriyo bakım ortamında (MMS) alt kültüre alarak denemişlerdir. 150 ve 180 g/l sakaroz içeren MMS ortamlarının 60, 90 ve 120 g/l sakaroz içeren MMS ortamıyla kıyaslandıklarında embriyogenik kültürlerin büyümesini ve gelişmesini engelledikleri görülmüştür. 90 ve 120 g/l sakaroz içeren MMS ortamında 60 g/l sakaroz içeren MMS ortamina göre embriyogenik hücrelerin büyümesi için kültürün kuru ağırlığı oldukça önemli derecede büyük olmuştur ki buda embriyogenik hücrelerin 90 ve 120 g/l sakaroz içeren MMS ortamında daha iyi geliştiğini göstermiştir. Embriyogenik hücrelerin 90 ve 120 g/l sakaroz içeren MMS ortamında inkübe edilmesiyle zigotik embriyolara benzeyen kotiledon aşamasındaki somatik embriyoların miktarı sırasıyla 10.8'den 21.3'e artmıştır. Somatik embriyoların çimlenmesi ve bitki gelişimi BA'li çimlenme ortamına transfer edilmeden önce 150 g/l sakaroz içeren MMS ortamında inkübe edilmesi ile sağlanmıştır. Bununla birlikte bu ortamda, diğer sakaroz konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında, pek çok embriyo üretilebilmiştir. Araştırmacılar 120 g/l sakaroz içeren MMS ortamında oluşan embriyogenik kültürlerin 150 g/l sakaroz içeren MMS ortamina bir kez transfer edilmesiyle embriyo gelişiminin ve bitki rejenerasyonunun artırılabilceğini belirtmişlerdir. Öte yandan, 1 den 10 mM'a kadarki MGBG embriyogenik kültürlerin büyümesini ve gelişmesini engellemiş ve hatta kültürün üçüncü ayında ölümüne neden olmuştur.

Çalışmalarında kullandıkları farklı genotiplerden *in vitro*'da 2 mg/l BA bulunan NN ortamında boğum kültürü yoluyla sürgün elde eden Martinelli ve ark. (1996), bu sürgünlerden aldıkları yaprakları 2.25 mg/l BA ve 0.03 mg/l NAA bulunan  $1/2$  MS ortamında kültüre almışlardır. çalışmada, morfojenik potansiyel üzerine genotipin etkili olduğu belirlenmiştir. Araştırmada test edilen 18 genotipte rejenerasyon oranı genotiplere göre değişmiş ve bitki oluşumu farklı sürelerde meydana gelmiştir.

Scorza ve ark. (1996) Thompson Seedless üzüm çeşidinin *in vitro*'da yetişen bitkiciklerinden alınan yapraklardan elde edilen somatik embriyolardan transgenik asma bitkileri yetiştirmişlerdir.

Heloir ve ark. (1997) çalışmalarında *Vitis vinifera* cv. Pinot noir çeşidinin *in vitro*'da yetiştirilen yanal tomurcuklarını hızlı mikroçoğaltımda yeni bir yöntem geliştirmek amacıyla kullanmışlardır. Bunun için temel besin ortamı olarak MS kullanılmıştır. Mikroçoğaltımın erken safhasında sitokin'in etkisini belirlemek için 1.1, 2.2, 4.4, 6.7 ve 8.9  $\mu\text{M}$  olmak üzere BA'nin 5 konsantrasyonu denenmiştir. 1.1 ve 2.2  $\mu\text{M}$  BA sadece ana sürgün gelişimini sağlamış fakat yanal tomurcukların oluşmasını engellemiştir. 4.4  $\mu\text{M}$  BA yanal tomurcukların gelişmesini uyarmıştır. 8.9  $\mu\text{M}$  BA ise ana sürgünün gelişmesini durdurmuş ve yanal tomurcukların gelişimini artırmıştır. BA konsantrasyonunun artmasıyla sürgün çoğalma hızı da artmıştır. Ancak alt kültür ortamında BA konsantrasyonunun 8.9  $\mu\text{M}$ 'dan 4.4  $\mu\text{M}$ 'a düşürülmesi vitrifikasyon oranını azalttığından iyi bir proliferasyon sağlamıştır. Sürgünlerin köklendirilmesinde NAA ve IBA 2.5 ve 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda denenmiştir. Oksin bulunmayan ortam kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçta 2.5  $\mu\text{M}$  IBA kullanılan ortamda sürgünlerdeki köklenme oranı %100 olarak bulunmuştur.

Büyükdemirci (1997), çalışmasında *in vitro*'da kültüre aldığı Valiant, Chancellor ve St. Croix çeşitlerinin yapraklarından direkt sürgün oluşumu ve bitki elde edilmesi üzerine ortam, sakaroz, oksin ve sitokin tipi ve konsantrasyonlarının etkili olduğunu belirlemiştir. *In vitro*'dan elde edilen yaprakların üst yüzeyi ortama değecek şekilde yerleştirildiğinde yaprak sapı ve/veya yaralanmış damarlardan direkt rejenerasyon meydana gelmiştir. Çoğunlukla NN ortamı MS ortamından daha yüksek rejenerasyon yüzdesi oluşturmuştur.

Göktürk Baydar ve Çelik (1999) yaptıkları çalışmalarında sürgün ucu kaynağının *in vitro* mikroaşılama başarı üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bitkisel materyal olarak Kalecik karası, Emir, Uslu, Hafızali ve Razakı üzüm çeşitlerine ait sürgün ucu meristemleriyle Kober 5 BB anacına ait çöğürleri kullanmışlardır. Sürgün ucu meristemleri hem *in vivo*, hem de *in vitro* kaynaklardan alınmıştır. Bu sürgün uçlarıyla tepeye yerleştirme yöntemiyle aşılana bitkiler, katı MS ortamında iki ay süreyle kültüre alınmışlardır. Sonuçta, aşı tutma oranlarının sürgün ucu kaynağına göre değiştiğini ve en yüksek aşı tutma oranlarının (%40.9-68.2) *in vitro* sürgün ucu ile aşılana bitkilerden elde edildiğini belirtmişlerdir. Aşı tutma oranlarındaki bu

artırılmasıyla ve 3 mg/l NAA eklenmesiyle elde edilen 5 mmol/l  $Ca^{+2}$  ve 6 mmol/l  $Ca^{+2}$  modifiye ortamlarından elde etmişlerdir.

Youngju ve ark. (2001) çalışmalarında *V. labruscana* x *V. vinifera* melezi olan Kyoho üzüm çeşidinin yaprak eksplantlarından organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunu sağlamak için ortam bileşimini ve kültür koşullarını iyileştirmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar, *in vitro*'da kültüre aldıkları yaprak parçalarından adventif sürgün oluşumunun, temel ortam, bitki büyüme düzenleyicileri ve ışık gibi faktörlerden etkilendiğini belirlemişlerdir. Modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde, adventif sürgünler etkili olarak rejenerasyon edilmiştir. En iyi sürgün rejenerasyonu karanlıkta 3 hafta süreli inkübasyondan sonra elde edilmiştir.

Gök Tangolar (2002) çalışmasında 41 B Amerikan asma anacı ve Yalova İncisi üzüm çeşidinin farklı eksplantlarından, embriyogenesis ve organogenesis yoluyla bitki elde edilmesinde farklı besin ortamları ve büyümeyi düzenleyici maddeler ile kültür koşullarının etkisini araştırmıştır. Somatik embriyogenesisde kullanılan bütün eksplantlarda değişen oranlarda embriyogenik kallus meydana gelmiş ancak, yalnızca olgunlaşmamış zigotik embryo eksplantından somatik embriyolar elde edilmiştir. Organogenesis çalışmalarında adventif göz oluşumu bakımından her iki genotipe de en uygun eksplantın yaprak ayası olduğu belirlenmiştir.

Araştırmalarında interspesifik asma hibritleri olan Bianca, Podarok Magaracha ve Intervitis Magaracha'nın *in vitro*'da yetişen bitkiciklerinin yaprak saplarını kullanan Zlenko ve ark. (2002) 2,4-D ve BA'in çeşitli konsantrasyonlarının kullanıldığı katı NN ortamında bu eksplantları kültüre almışlardır. Gelişmiş kalluslar somatik embriyoları oluşturmak için 0.5 mg/l BA içeren sıvı NN ortamında kültür edilmiştir. Podarok Magaracha ve Intervitis Magaracha'nın Globular ve kalp şekilli somatik embriyoları süspansiyon kültürlerinde gelişme göstermişlerdir. Buna karşılık, Bianca'da globular safhasından öteye gidilememiştir. Bu globular embriyoların kalp safhasında gelişme gösterebilmesi için süspansiyonların 0.2 mg/l BA içeren HTE sıvı ortamında alt kültürünün gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Her üç çeşidinde 0.1 mg/l IAA ve 30 mg/l sodyum humat içeren sıvı HTE ortamına alt kültüründen sonra

farklılığa rağmen, sürgün ucu kaynağının mikroaşılarda sürgün ve kök gelişmesini fazla etkilemediği saptanmıştır. Ayrıca, asma mikroaşılarda başarının çeşitler arasında farklılıklar gösterdiği de tespit edilmiştir.

Organogenesis yoluyla 5 üzüm çeşidi (Atasarısı, Çavuş, Kalecik karası, Sultani çekirdeksiz ve Yapıncak) ile 2 asma anacına (Kober 5 BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) ve 41 B MG (Chasselas x *V. berlandieri*)) ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün gelişimi üzerine etkili olan genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamlarının etkilerini inceleyen Göktürk Baydar (2000) eksplant kaynağı olarak *in vitro* sürgünlerden izole edilen yaprak sapı ve ayalarını kullandığı araştırmasında, adventif sürgün gelişimi ile ilgili en yüksek değerleri yaprak saplarından elde ettiğini belirtmiştir. Yaprak eksplantları, değişik oranlarda BAP ve NAA katkılı MS ve NN besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Araştırma sonunda, adventif sürgün oluşumu için en uygun besin ortamının Kalecik karası, Çavuş, Sultani Çekirdeksiz ve Kober 5 BB için 2 mg/l BAP katkılı MS besin ortamının olduğu tespit edilmiştir. Bu besin ortamında kültüre alınan Kalecik karası, Çavuş, Sultani çekirdeksiz ve Kober 5 BB'ye ait yaprak saplarının %34.7-56.0'sı, yaprak ayalarının da %18.7-22.7'si adventif sürgün oluşturmuşlardır. Yapıncak, Atasarısı ve 41 B M.G. için de 2 mg/l BAP katkılı NN ortamının adventif sürgün oluşumu için en uygun besin ortamı olduğunun belirlendiği çalışmada, bu genotiplere ait yaprak saplarının %16.0-34.7'sinin, yaprak ayalarının da %8.0-14.7'sinin adventif sürgün oluşturdukları tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca adventif sürgün oluşturma yetenekleri bakımından genotipler arasında farklılıklar bulunduğu da belirlenmiştir.

Altun ve Yürekli (2000)'de çalışmalarında kalsiyum miktarı değiştirilerek hazırlanmış 5 farklı MS ortamından elde edilen kallogenez ve rejenerasyon sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak en iyi kallus verimini % 100 ile MS ortamındaki kalsiyum miktarının azaltılmasıyla ve 3 mg/l NAA eklenmesiyle hazırlanmış 2 mmol/l  $Ca^{+2}$  ve 3 mmol/l  $Ca^{+2}$  numaralı ortamlardan elde etmelerine rağmen en iyi kallus biyomasını normal MS ortamında gözlemlemişlerdir. En iyi gövde ve kök gelişimini ise MS ortamındaki kalsiyum iyonunun miktarının

kalp aşamasındaki embriyolar torpedo aşamasına dönüşmüştür. Torpedo aşamasındaki embriyolar 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.2 mg/l BA içeren sıvı HTE ortamında alt kültür edilmişlerdir. Kültürün 12. gününden sonra bitkicikler büyüme düzenleyicilerin olmadığı ve 0.5 mg/l BA içeren katı M2MS ortamında kültür edilmiştir. 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.2 mg/l BA içeren sıvı HTE ortamında gelişen bitkicikler kültürün 50. gününden sonra 0.5 mg/l BA içeren katı M2MS ortamında % 82-90 sürgün üretmiştir.

Göktürk Baydar ve Çetin (2003) araştırmalarında Sultani çekirdeksiz ve Kalecik karası ile 41B M.G. ve Kober 5BB asma anaçlarına ait *in vitro* bitkilerden elde edilen yaprak ayaları ile yaprak saplarını kullanmışlardır. Eksplantlar temel besin ortamı olarak MS ve NN' in kullanıldığı 26 farklı besin ortamına dikilmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda organogenesis yoluyla adventif kök ve sürgün oluşumu ile A tipi kallus oluşumunun genotip, eksplant tipi ve kullanılan besin ortamlarına göre değiştiğini tespit etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak yerli şaraplık üzüm çeşitlerimizden Kalecik karası'na ait çeliklerden sürdürülen sürgün ve boğum parçacıklarının kültüre alınmasıyla elde edilen yaprak sapsarı, yaprak ayaları ve gövde eksplantları kullanılmıştır. Çelikler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan Kalecik karası üzüm çeşidine ait bazı önemli özellikler Çelik (2002)'den yararlanılarak Çizelge 3.1.1.'de sunulmuştur.

**Çizelge 3.1.1.** Denemede kullanılan Kalecik karası üzüm çeşidine ait bazı özellikler

Çeşitler		Kalecik karası
Değerlendirme şekli		Şaraplık
Salkım	Şekli	Konik, kanatlı
	Büyükülüğü	Küçük, orta
	Sıklığı	Sık
Tane	Şekli	Yuvarlak
	Büyükülüğü	Küçük, orta
	Rengi	Mavimsi siyah
	Çekirdek sayısı	1-2
Gelişme kuvveti		Kuvvetli
Verimlilik durumu		Yüksek
Olgunlaşma zamanı		Orta mevsim
Budama şekli		Yarı uzun, kısa
Yöresi		Ankara, Kırıkkale

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Eksplantların Hazırlanması

Değişik eksplantların *in vitro* rejenerasyon kapasitelerini belirlemek amacıyla yapılmış olan bu araştırmada, öncelikle eksplantların alınacağı *in vitro* sürgünlerin elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Kalecik karası üzüm

çeşidine ait kış dinlenmesini tamamlamış 1 yaşlı dallardan hazırlanan çelikler iklim odasına alınarak su içinde sürdürülmüşlerdir.

### **3.2.2. Eksplantların Dezenfeksiyonu**

Taze sürgünlerden alınan sürgün uçları ile üzerinde tek göz bulunduran boğumlar 1-2 damla 0.01'lik Tween 20 maddesi ilave edilmiş %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi kullanılarak 15 dakika dezenfekte edilmiştir. Dezenfeksiyon sonrası materyaller, her biri en az 5 dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile durulanmışlardır.

### **3.2.3. Sürgün Ucu Kaynağı ve *In Vitro* Bitkiciklerin Yetiştirilmesi**

Dezenfeksiyon işleminin ardından sürgün uçları, meristem ile 3-4 yaprak taslağı; boğumlar da 1 gözlü olacak şekilde hazırlanmışlardır. İzole edilen bu sürgün uçları ve boğumlu mini çelikler içerisinde 10 ml 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ve 2.5 mg/l BAP ilave edilmiş Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) steril besin ortamı bulunan 15x1.5 cm boyutlarındaki cam deney tüplerinde kültüre alınmışlardır. Ortama ayrıca 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar katılarak, pH 5.8'e ayarlanmıştır. Dikim işlemi tamamlandıktan sonra, iklim odalarında atmosferden oluşabilecek bulaşmaları önlemek amacıyla tüplerin ağızları parafilm ile sıkıca sarılmıştır. Sürgün uçları ve boğumlu mini çelikler bu ortamda 2000-2200 lux ışık yoğunluğunda, 16 h ışıklandırma rejiminde ve 25±1 °C sıcaklıkta kültüre alınmışlardır.

### **3.2.4. *In Vitro* Sürgünlerin Çoğaltılması**

İlk dikim ortamında 4 haftalık gelişmelerini tamamlayan sürgün uçları ve boğumların dip kısımlarından 1-2 mm uzunluğunda kesimler yapılarak, 0.5 mg/l IBA ve 1.0 mg/l BAP katkılı MS besin ortamından 100 ml içeren 250 ml'lik erlen mayerlerde kültüre alınarak, deneme için yeterli sayıda sürgün oluşana kadar 4'er hafta aralıklarla alt kültüre alınmışlardır. Sürgün ortamlarına 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ilave edilerek, pH 5.8'e ayarlanmıştır. Araştırmada kültüre alınan sürgün ucu ve boğumların iklim odasındaki genel görünüşleri Şekil 3.2.4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.4.1. İklim odasının genel görünüşü

### 3.2.5. *In Vitro* Sürgünlerin Köklendirilmesi

Sürgünler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra köklenmeleri için 5 mg/l IBA içeren MS besin ortamına transfer edilmişlerdir. Daha sonra bu *in vitro* bitkiciklerden alınan yaprak ayaları, yaprak sapları ve gövde eksplantları daha sonraki aşamalarda kullanılmışlardır. Şekil 3.2.5.1’de eksplant kaynağı olarak kullanılan Kalecik karası’na ait *in vitro* bitki görülmektedir. Tüm ortamlarda pH 5.8’e 1 N NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanmış ve ortamlar, otoklavda 121 °C’ de ve 1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir.



**Şekil 3.2.5.1.** Eksplant kaynağı olarak kullanılan Kalecik karası'na ait *in vitro* bitki

### **3.2.6. In Vitro Bitkiciklerden Eksplantların Hazırlanması**

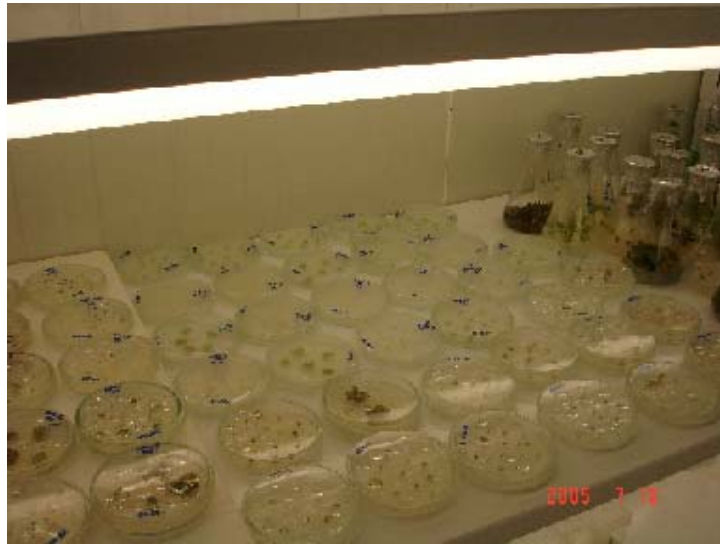
Eksplant olarak *in vitro* bitkiciklerden alınan yaprak sapı, yaprak ayası ve gövde parçacıkları kullanılmıştır. Yaprak sapı ve gövde eksplantları 2-3 mm büyüklüğünde kesilerek dikime hazır hale getirilirken; yaprak ayaları iki şekilde hazırlanmıştır. İlkinde cork borer ile 0.5 cm çapında yuvarlak olarak, ikincisinde de tüm yaprak üzerinde yaprak ana damarına dik olacak şekilde birbirine paralel üç kesim yapılarak hazırlanmıştır.

### **3.2.7. Eksplantların Dikildiği Besin Ortamları**

Araştırmada farklı eksplantların rejenerasyonunu sağlamak için değişik araştırmacılar tarafından belirlenen MS ve NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ortamlarının BAP, Zeatin, 2,4-D, ABA ve Kazein hidrolizat'lı kombinasyonları kullanılmış olup, bu ortamlar Çizelge 3.2.7.3'de verilmiştir. Her bir temel ortam için stok solüsyonlar (Çizelge 3.2.7.1. ve 3.2.7.2.) hazırlanmış ve ortam hazırlamada bu stok solüsyonlardan yararlanılmıştır.

### 3.2.8. Kültür Koşulları

*In vitro* bitkiciklerden alınan eksplantlar 9 cm çapındaki petriyeler içerisine dikilerek, sıcaklığı 25±1 °C olarak ayarlanmış iklim odalarında iki farklı ışıklandırma rejiminde tutulmuşlardır. Bu amaçla, kültürlerden bir kısmı karanlık, bir kısmı da gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 2000-2200 lux olarak ayarlanmış iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Araştırmada petriyeler içindeki kültürlerin genel görünüşleri Şekil 3.2.8.1.'de gösterilmiştir.

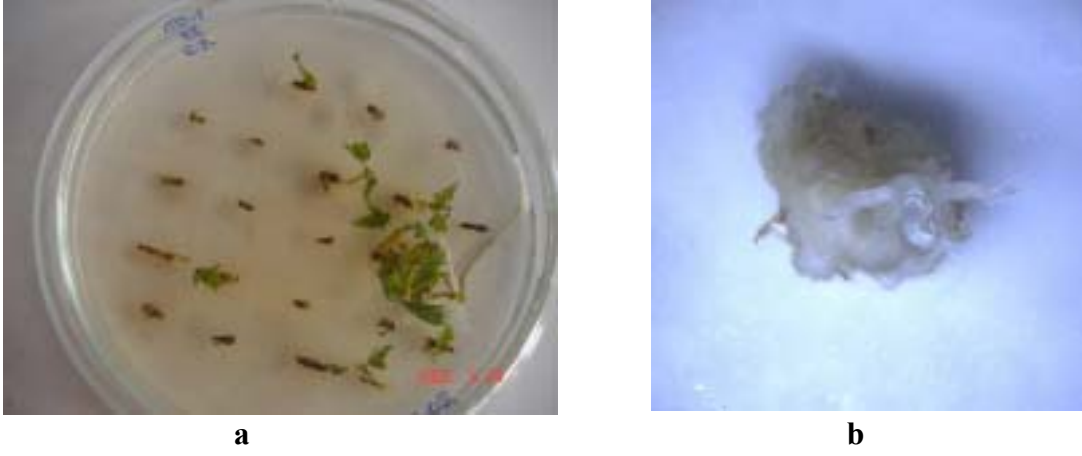


Şekil 3.2.8.1. Kültürlerin iklim odasındaki genel görünüşleri.

### 3.2.9. İncelenen Özellikler

Dikimden sonraki 4. haftanın sonunda kültüre alınan yaprak sapı, yaprak ayası ve gövde eksplantları aőaęıdaki kriterler bakımından incelenmişlerdir.

**Adventif sürgün oluşturan eksplant oranı (%):** Adventif sürgün gelişimi gösteren eksplantların toplam eksplant sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Eksplantlardan elde edilen direkt ve indirekt adventif sürgünler Şekil 3.2.9.1 a ve b'de sunulmuştur.



**Şekil 3.2.9.1.** Direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu

**Adventif sürgünlerin bitkiye dönüşüm oranı (%):** Oluşan adventif sürgünlerden bitkiye dönüşenlerin (Şekil 3.2.9.2) elde edilen adventif sürgün sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir.



**Şekil 3.2.9.2.** Adventif sürgünlerden tam bitkiye dönüşümü sağlanmış bitki

**Kallus oluşturan eksplantların oranı (%):** Kallus oluşturan eksplant sayısının kültüre alınan toplam eksplant sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Kalluslarla ilgili olarak, kallusların renk, tip ve derecelerinin dikkate alındığı gözlemlerde aşağıda belirtilen özellikler incelenmiştir.

Farklı kallus tipleri:

**A:** Beyaz, sarı renkli, sert kırılğan yapıda sağlıklı görünümdeki kalluslar (Şekil 3.2.9.3)

**B:** Sarımsı kahve ya da kahverenginin değişik tonları, sulu yumuşak, kolay dağılabilen ya da beyaz pamuksu sağlıksız görünüme sahip kalluslar (Şekil 3.2.9.4)

Farklı kallus dereceleri:

**0:** Kurumuş

**1:** Canlı hiç kallus yok (Gelişme yok)

**2:** Eksplantın belli bir kısmında kallus var

**3:** Eksplantın her tarafında kallus var.



**Şekil 3.2.9.3.** Eksplantlardan elde edilen A tipi kallus



**Şekil 3.2.9.4.** Eksplantlardan elde edilen B tipi kallus

### **3.2.10. Kallusların Kültüre Alınması**

Elde edilen A tipi kalluslar daha sonra somatik embriyolar oluşturmak üzere 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ile 1 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BAP içeren NN besin ortamlarında 25 °C±1 sıcaklık ve karanlık koşullarda 1'er aylık periyotlarla aynı bileşimdeki taze ortamlarda 3 kez alt kültüre alınmışlardır.

Çizelge 3.2.7.1. MS temel besin ortamının bileşimi

I. İnorganik maddeler	II: Organik maddeler
<b>A. Makro elementler (mg/l)</b>	<b>1) Vitamin ve amino asitler (mg/l)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 1650	Myo-inositol : 100
KNO <sub>3</sub> : 1900	Thiamin HCL : 0.1
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O : 440	Pyridoxin HCL : 0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 170	Nicotinic acid : 0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 370	Glycine : 2.0
NaFeEDTA : 36.7	
<b>B. Mikro elementler (mg/l)</b>	
MnSO <sub>4</sub> : 16.0	
ZnSO <sub>4</sub> : 8.6	
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> : 6.2	
KI : 0.830	
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> : 0.250	
CuSO <sub>4</sub> : 0.025	
CoCl <sub>2</sub> : 0.025	

Çizelge 3.2.7.2. NN temel besin ortamının bileşimi

I. İnorganik maddeler	II: Organik maddeler
<b>A. Makro elementler (mg/l)</b>	<b>2) Vitamin ve amino asitler (mg/l)</b>
KNO <sub>3</sub> : 950	Myo-inositol : 100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 720	Glycine : 2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 185	Nicotinic acid : 5
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O : 166	Pyridoxin HCL : 0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 68	Thiamin HCL : 0.5
<b>B. Mikro elementler (mg/l)</b>	Folic asit : 0.5
MnSO <sub>4</sub> : 25	Biotin : 0.05
ZnSO <sub>4</sub> : 10	
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> : 0.25	
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> : 10	
CuSO <sub>4</sub> : 0.025	
<b>C. Demirli bileşik (g/l)</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 0.557	
Disodyumetilendiaminotetraoacetate : 7.450	

**Çizelge 3.2.7.3.** Eksplantların dikildiği besin ortamları

<b>BESİN ORTAMLARI MS/NN</b>	<b>BAP (mg/l)</b>	<b>ZEATİN (mg/l)</b>	<b>2,4-D (mg/l)</b>	<b>ABA (mg/l)</b>	<b>KAZEİN HİDROLİZAT (g/l)</b>	<b>AGAR (g/l)</b>	<b>SAKKAROZ (g/l)</b>
<b>1</b>	2	-	-	-	-	7	30
<b>2</b>	-	2	-	-	-	7	30
<b>3</b>	1	-	1	-	-	7	30
<b>4</b>	1	-	2	-	-	7	30
<b>5</b>	1	-	1	-	1	7	30
<b>6</b>	1	-	2	-	1	7	30
<b>7</b>	0.2	-	1	2.5	1	7	30
<b>8</b>	0.2	-	1	2.5	-	7	30
<b>9</b>	0.2	-	1	-	1	7	30
<b>10</b>	-	-	2	-	-	7	30

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular

Çizelge 4.1.1. ve 4.1.2.'de görüldüğü gibi, Kalecik karası üzüm çeşidine ait yaprak sapı eksplantlarının *in vitro* kallus oluşturma oranları ortamlara ve kültür koşullarına göre farklılıklar göstermiştir. Aydınlık koşullarda ve MS 1 ortamında kültüre alınan eksplantlar dışında diğer tüm uygulamalarda değişen oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Buna göre, karanlık uygulamasında en yüksek kallus oluşumu %100'lük oranla MS 4 ortamından elde edilirken, bunu %97.56 ile MS 6 ve %86.36 ile MS 5 ortamları izlemiştir. Karanlık koşullarda en düşük kallus oluşumunun MS 2 ortamında (%22.20) olduğu saptanmıştır. Aydınlık koşullarda ise en yüksek kallus oluşturma oranını %91.11 ile MS 3 ortamı gösterirken, bunu MS 5 (%74.41) ve MS 8 (%61.11) ortamları takip etmiştir. Kallus oluşumunun en düşük olduğu ortam ise aydınlık kültürün tam tersine MS 4 olmuştur. NN ortamları ve uygulamalarında kallus oluşum oranı MS ortamlarıyla kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuş, hatta birçok ortamda kallus oluşumuna rastlanamamıştır. En yüksek kallus oluşumu %45.00 ile NN 10 aydınlık uygulamasında elde edilirken, oluşan kalluslardan en düşük oran %5.12 ile NN 3 aydınlık kültürden elde edilmiştir. Genel olarak MS ortamlarında karanlık kültür koşulları daha iyi sonuç verirken, NN ortamlarında ise aydınlık kültür koşulları daha iyi sonuç vermiştir. Oluşan kallusların niteliğine bakıldığında sağlıklı görünüme sahip A tipi kalluslar, MS ortamlarının sadece karanlık uygulamalarında %12.50 ile MS 6'da ve %8.10 ile MS 3'de; NN ortamlarının ise sadece aydınlık kültür koşullarında NN 4 (%100) ve NN 2 (%70.00) ortamlarında gözlenmiştir.

Eksplantların farklı derecelerde kallus oluşturma oranlarının da incelendiği araştırmada, 0 dereceli kallus (canlılığını kaybeden eksplant) oluşumu NN ortamlarında en fazla %100'lük bir oranla NN 10 ortamının karanlık uygulamasından elde edilirken, MS ortamlarında ise bu oran en fazla %57.69 ile MS 1 aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. Canlılığını sürdüren fakat hiç kallus oluşturamayan eksplantlar (1 derece) en fazla %77.50 ile NN 1 karanlık uygulamasında

gözlenmiştir. MS ortamlarında bu oran %44.40'ın altında kalmıştır. 2 dereceli kallus oluşumu %100'lük bir oranla MS 1, MS 4 ve MS 7 karanlık uygulamalarında ortaya çıkmıştır. NN ortamlarında ise NN 3 ve NN 7 karanlık, NN 4 ve NN 10 aydınlık kültürlerinde %100'lük bir oran ile elde edilmiştir. 3 dereceli kallus oluşumu ise en fazla %100 ile NN 2 aydınlık uygulamasından elde edilirken, bu oran MS ortamlarında en fazla %90.62 ile MS 5 ve %82.35 ile MS 4 aydınlık uygulamalarından elde edilmiştir.

Yaprak sapı eksplantlarından adventif sürgün oluşturma oranlarına bakıldığında, direkt adventif sürgün oluşumu %2.38 ile en fazla aydınlık koşullarda kültüre alınan MS 7 ortamındaki eksplantlardan elde edilmiştir. MS 1 aydınlık ve karanlık, MS 2 karanlık, MS 4 aydınlık dışındaki uygulamalarda ise direkt adventif sürgün oluşumu gözlenememiştir. NN ortamında ise direkt adventif sürgün oluşumu yalnızca NN 3 karanlık (%2.63) ve NN 1 aydınlık (%2.43) uygulamalarında gözlenmiştir. Yine aynı şekilde indirekt adventif sürgün oluşumunun meydana gelme oranına bakıldığında, en fazla %6.97 ile MS 5 aydınlık ortamından elde edildiği, bunu %5.00 ile MS 9 aydınlık uygulamasının izlediği saptanmıştır. NN ortamında indirekt adventif sürgün oluşumu yalnızca NN 1 aydınlık uygulamasından (%2.43) elde edilmiştir. Adventif sürgünlerin bitkiye dönüşüm oranı MS 1 aydınlık ve karanlık, MS 2 karanlık, MS 7 aydınlık ve NN 3 karanlık uygulamalarında kültüre alınan eksplantlarda %100 olmuştur.

4 haftalık gelişme döneminin sonunda, 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ile 1 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BAP içeren NN ortamlarında kültüre alınan A tipi kallusların bir kısmı dikimlerini takiben birkaç hafta içerisinde canlılıklarını yitirmişler, diğerlerinde ise somatik embriyogenesis oluşumu gözlenememiştir.

**Çizelge 4.1.1.** Yaprak sapı eksplantlarının farklı büyüme düzenleyici madde içeren MS ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
MS-1	Aydınlık	52	0	0	0	57.69	40.38	0	0	1.92	0	100
	Karanlık	48	33.30	0	100	0	39.50	100	0	2.00	0	100
MS-2	Aydınlık	45	40.00	0	100	44.44	13.33	27.77	72.22	0	2.22	0
	Karanlık	45	22.20	0	100	0	44.40	60.00	40.00	2.00	0	100
MS-3	Aydınlık	45	91.11	0	100	6.66	2.22	36.58	63.41	0	0	0
	Karanlık	53	69.81	8.10	91.89	0	28.30	29.72	70.27	0	1.75	0
MS-4	Aydınlık	46	36.95	0	100	0	39.13	17.64	82.35	2.17	4.34	33.33
	Karanlık	25	100	0	100	0	0	100	0	0	0	0
MS-5	Aydınlık	43	74.41	0	100	0	18.60	9.37	90.62	0	6.97	0
	Karanlık	44	86.36	0	100	11.36	0	18.42	81.57	0	2.27	0
MS-6	Aydınlık	45	40.00	0	100	0	26.66	16.66	50.00	0	0	0
	Karanlık	41	97.56	12.50	87.5	0	0	30.00	70.00	0	2.43	0
MS-7	Aydınlık	42	57.14	0	100	40.47	0	20.83	79.16	2.38	0	100
	Karanlık	39	76.92	0	100	0	5.12	100	0	0	0	0
MS-8	Aydınlık	36	61.11	0	0	11.11	27.77	36.36	63.63	0	0	0
	Karanlık	39	84.61	0	100	0	0	66.66	33.33	0	0	0
MS-9	Aydınlık	40	45.00	0	100	22.50	12.50	38.88	61.11	0	5.00	0
	Karanlık	38	39.47	0	100	0	0	20.00	80.00	0	0	0
MS-10	Aydınlık	40	50.00	0	100	15.00	0	50.00	50.00	0	0	0
	Karanlık	39	56.41	0	100	28.20	15.38	18.18	81.81	0	0	0

**Çizelge 4.1.2.** Yaprak sapı eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamları ile farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
NN-1	Aydınlık	41	0	0	0	12.19	0	0	0	2.43	2.43	50.00
	Karanlık	40	0	0	0	0	77.50	0	0	0	0	0
NN -2	Aydınlık	42	23.80	70.00	30.00	0	52.38	0	100	0	0	0
	Karanlık	42	23.80	0	100	38.09	35.71	30.00	70.00	0	0	0
NN -3	Aydınlık	39	5.12	0	100	0	28.20	50.00	50.00	0	0	0
	Karanlık	38	7.89	0	100	42.10	47.36	100	0	2.63	0	100
NN -4	Aydınlık	41	9.75	100	0	60.97	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	39	0	0	0	48.71	48.71	0	0	0	0	0
NN -5	Aydınlık	51	25.49	0	100	0	64.70	53.84	46.15	0	0	0
	Karanlık	41	0	0	0	51.21	39.02	0	0	0	0	0
NN -6	Aydınlık	40	0	0	0	45.00	32.50	0	0	0	0	0
	Karanlık	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NN -7	Aydınlık	44	0	0	0	52.27	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	21	9.52	0	100	0	47.61	100	0	0	0	0
NN -8	Aydınlık	45	0	0	0	35.55	8.88	0	0	0	0	0
	Karanlık	37	0	0	0	56.75	8.10	0	0	0	0	0
NN -9	Aydınlık	21	0	0	0	0	4.76	0	0	0	0	0
	Karanlık	43	0	0	0	0	46.51	0	0	0	0	0
NN -10	Aydınlık	40	45.00	0	100	55.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	46	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0

## 4.2. Gövde Eksplantından Elde Edilen Bulgular

Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkiciklerinden alınan gövde eksplantlarından elde edilen ve Çizelge 4.2.1. ve 4.2.2.'de verilen bulgular incelendiğinde MS 2 ortamı aydınlık ve karanlık, NN 6 aydınlık ve karanlık ile NN 7 karanlık uygulamaları hariç diğer tüm uygulamalarda değişen oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Buna göre MS ortamının karanlık uygulamalarında en yüksek kallus oluşum oranı %95.00 ile MS 8 karanlık uygulamasından elde edilirken, bunu %94.59 ile MS 7 karanlık uygulaması izlemiştir. En düşük kallus oranını %7.50 ile MS 6 aydınlık uygulaması göstermiştir. NN ortamının karanlık uygulamalarında ise en yüksek kallus oluşumu NN 1 ortamında (%28.20) saptanırken, bunu %17.07 ile NN 9 ortamı izlemiştir. NN 5 ortamı ise %2.50 ile en düşük kallus oluşturan ortam olmuştur. Aydınlıkta kültür edilen eksplantlarda ise MS 10 ortamı %89.74 ile en yüksek kallus oluşum oranına sahip olurken, en düşük kallus oluşum oranı %7.50 ile MS 6 ortamından elde edilmiştir. NN temel besin ortamının kullanıldığı ortamlarda ise en iyi kallus oluşum oranı NN 10 ortamından (%52.08), en düşük kallus oranı da %4.65 ile NN 1 ortamından elde edilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere NN ortamlarının tüm uygulamaları kallus oluşturma oranları bakımından MS ortamlarının tüm uygulamalarından daha düşük olmuştur. A tipi kallus oluşumu MS ortamlarında yalnızca MS 9 karanlık uygulamalarında %100 olarak ortaya çıkarken, NN ortamlarında ise sadece NN 2 aydınlık (%75.00) ve NN 9 aydınlık (%50.00) uygulamalarında saptanmıştır.

Canlılığını kaybeden eksplant oranı (0 dereceli kallus) denemede kullanılan ortamlara ve kültür koşullarına göre farklılık göstermiştir. En yüksek oran %51.16 ile NN 10 karanlık ortamında gözlenmiş, MS ortamında ise bu oran %42.50 bulunmuştur. 1 dereceli kallus oluşumu MS ortamlarında ve kültür koşullarında yarı yarıya olmuştur. 1 dereceli kallus oluşumu MS ortamında %6.00-61.70 arasında olmuştur. NN ortamında ise bu oranın %4.34-37.20 arasında değişmiştir. 2 dereceli kallus oluşumu en fazla %100 ile MS 1 karanlık ve MS 6 aydınlık uygulamalarından elde edilmiştir. NN ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda 2 dereceli kallus oluşumu, MS ortamlarında kültüre alınanlara göre daha yüksek bulunmuştur. 3

dereceli kallus oluşumu bakımından yapılan incelemede MS ortamının NN ortamından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Eksplantların adventif sürgün oluşturma durumları incelendiğinde, MS ortamında direkt adventif sürgün oluşumunun en fazla MS 1 ortamının karanlık uygulamasında (%33.30) bulunurken, bunu %32.50 ile MS 2 aydınlık uygulamasının izlediği belirlenmiştir. En yüksek indirekt adventif sürgün oluşumu ise %46.60 ile MS 9 karanlık uygulamasından elde edilmiştir. NN ortamında direkt adventif sürgün oluşturma yeteneği bakımından en yüksek değeri NN 1 aydınlık uygulaması verirken, indirekt adventif sürgün oluşumunda ise en yüksek değeri NN 2 aydınlık uygulaması vermiştir. Bunun yanı sıra hem MS hem de NN ortamlarından çoğunda ne direkt ne de indirekt adventif sürgün gelişimi gözlenememiştir.

Gövde eksplantlarından elde edilen A tipi kalluslar 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamına ve 1 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BAP içeren NN ortamına aktarıldıklarında herhangi bir somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

**Çizelge 4.2.1.** Gövde eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
MS-1	Aydınlık	47	10.63	0	100	0	61.70	0	100	0	27.65	23.00
	Karanlık	45	40.00	0	100	0	0	100	0	33.30	0	73.30
MS-2	Aydınlık	40	0	0	0	42.50	25.00	0	0	32.5	0	76.92
	Karanlık	45	0	0	0	22.22	0	0	0	28.80	0	92.30
MS-3	Aydınlık	45	35.55	0	100	31.11	0	12.50	87.5	4.44	6.66	40.00
	Karanlık	46	73.91	0	100	0	35.29	14.70	85.29	0	0	0
MS-4	Aydınlık	46	45.65	0	100	2.17	0	19.04	80.95	13.04	4.34	75.00
	Karanlık	40	62.50	0	100	5.00	0	12.00	88.00	0	5.00	20.00
MS-5	Aydınlık	41	24.39	0	100	0	0	40.00	60.00	0	0	0
	Karanlık	37	21.62	0	100	0	18.91	37.50	62.50	0	0	0
MS-6	Aydınlık	40	7.50	0	100	30.00	25.00	100	0	0	0	0
	Karanlık	50	84.00	0	100	2.00	6.00	7.14	92.85	0	0	0
MS-7	Aydınlık	35	42.85	0	100	2.85	22.85	0	100	0	0	0
	Karanlık	37	94.59	0	100	0	0	25.71	74.28	0	0	0
MS-8	Aydınlık	40	57.50	0	100	40.00	0	30.43	69.56	0	0	0
	Karanlık	40	95.00	0	100	0	0	21.05	78.94	0	0	0
MS-9	Aydınlık	43	48.83	0	100	20.93	9.30	14.28	85.71	11.62	2.32	66.66
	Karanlık	15	46.60	100	0	0	6.66	0	100	0	46.60	28.57
MS-10	Aydınlık	39	89.74	0	100	7.69	0	14.28	85.71	0	2.56	0
	Karanlık	40	70.00	0	100	0	17.50	37.71	64.28	0	0	0

**Çizelge 4.2.2.** Gövde eksplantlarının farklı büyüme düzenleyici madde içeren NN ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
NN-1	Aydınlık	43	4.65	0	100	25.58	25.58	100	0	13.95	0	83.33
	Karanlık	39	28.20	0	100	0	7.69	36.36	63.63	10.25	2.25	60.00
NN -2	Aydınlık	41	19.51	75.00	25.00	0	4.87	0	100	2.43	14.63	14.28
	Karanlık	40	5.00	0	100	45.00	27.50	100	0	0	10	0
NN -3	Aydınlık	41	17.07	0	100	7.31	7.31	57.14	42.85	7.31	4.87	40.00
	Karanlık	40	10.00	0	100	0	30.00	100	0	2.50	2.50	100
NN -4	Aydınlık	42	28.57	0	100	0	16.66	100	0	0	0	0
	Karanlık	45	11.11	0	100	44.44	15.55	80.00	20	0	0	0
NN -5	Aydınlık	43	20.93	0	100	0	37.20	0	100	0	0	0
	Karanlık	40	2.50	0	100	0	30.00	100	0	0	0	0
NN -6	Aydınlık	43	0	0	0	41.86	32.55	0	0	0	0	0
	Karanlık	42	0	0	0	47.61	21.42	0	0	0	0	0
NN -7	Aydınlık	48	6.25	0	100	35.41	0	0	100	8.33	2.08	60.00
	Karanlık	23	0	0	0	0	4.34	0	0	0	0	0
NN -8	Aydınlık	45	15.55	0	100	31.11	17.77	85.71	14.28	0	0	0
	Karanlık	37	8.10	0	100	0	24.32	100	0	2.70	0	100
NN -9	Aydınlık	44	22.72	50.00	50.00	0	11.36	30.00	70.00	6.81	0	100
	Karanlık	41	17.07	0	100	0	0	100	0	0	0	0
NN -10	Aydınlık	48	52.08	0	100	0	0	100	0	6.25	4.16	60.00
	Karanlık	43	6.67	0	100	51.16	13.95	100	0	0	0	0

### 4.3. Yaprak Ayası Eksplantlarından Elde Edilen Bulgular

Araştırmada *in vitro* bitkilerden alınan yaprak ayları iki şekilde hazırlanarak dikilmişlerdir. İlkinde tüm yaprak üzerinde yaprak ana damarına dik olacak şekilde birbirine paralel üç kesim yapılarak, ikincisinde ise cork borer ile 0.5 cm çapında yuvarlak olarak hazırlanmışlardır (Şekil 4.3.1.).



Şekil 4.3.1. Yaprak aylarına uygulanan farklı kesim şekilleri

Bisturi ile çizikler açılmış yaprak ayası eksplantlarından elde edilen bulgular incelendiğinde, MS ortamının aydınlık ve karanlık uygulamalarında kallus oluşturan eksplantların oranı, genel olarak karanlık kültürlerde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.3.1. ve 4.3.2.). MS ortamında en yüksek değeri MS 9 ve MS 10 karanlık uygulamaları (%100) vermiş olup, bunları %92.30 ile MS 3 ve MS 4 karanlık uygulamaları izlemiştir. Bunun yanı sıra bazı ortamlarda ise hiç kallus oluşumu gözlenememiştir (MS 1 karanlık; MS 2 aydınlık, karanlık; MS 5, MS 7, MS 9 aydınlık). NN 5 ortamının karanlık uygulaması dışında diğer tüm ortamlar ve uygulamalarında değişen oranlarda kallus oluşumu belirlenmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı %100 ile NN 8 aydınlık, en düşük değer de %11.11 ile NN 7 aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. A tipi kallus oluşumu MS ortamının üç uygulaması dışında hiçbir ortamda saptanamamıştır. Bunlar sırasıyla MS 5 karanlık (%42.85), MS 6 karanlık (%33.33) ve MS 10 karanlık (%25.00) uygulamalarıdır. NN ortamında ise NN 2 aydınlık uygulaması %50.00 oranında A tipi kallus oluşturmuştur. Bunun dışındaki hiçbir ortam ve uygulamasında A tipi kallus oluşumu görülmemiştir.

Eksplantların kallus oluşturma oranının da incelendiği araştırmada kuruyarak canlılığını kaybeden eksplant (0 dereceli kallus) oranına bakıldığında en yüksek değer MS 2 ve MS 9 aydınlık ve NN 5 karanlıktan (%100) elde edilmiştir. MS ortamlarında 1 dereceli kallus oluşumu en fazla MS 1 karanlık ile MS 5 aydınlık uygulamalarından (%100) elde edilmiştir. Genel olarak 1 dereceli kallus oluşumunun görülmediği ancak bunun dışında oluşan oranın %7.69-50.00 arasında değiştiği saptanmıştır. NN ortamında ise en yüksek oluşumun %80.00 ile NN 9 aydınlık uygulamasından elde edildiği görülmüştür. 2 dereceli kallus oluşumu MS in çoğu uygulamalarında gözlemlenmiş olup, 3 dereceli kallus oluşumu ise yalnızca MS ortamlarından sadece A tipi kallus oluşan ortamlarda ve uygulamalarında görülmüştür. Yani MS 5 karanlık (%42.85), MS 6 karanlık (%33.33) ve MS 10 karanlık (%25.00) uygulamalarıdır. NN ortamlarında 2 dereceli kallus oluşumu NN 5 karanlık uygulamasında hiç görülmezken NN 2 karanlık uygulamasında ise %25.00 oranında görülmüştür. Bunun dışındaki tüm ortamlar ve uygulamalarındaki tüm eksplantlarda (%100) 2 dereceli kallus oluşumu saptanmıştır. 3 dereceli kallus oluşumu ise sadece %75.00 ile NN 2 aydınlık uygulamalarında görülmüştür.

Farklı besin ortamı ve kültür şartlarının uygulandığı araştırmada, bisturi ile çizikler açılmış yaprak ayası eksplantlarının hiç birinden adventif sürgün gelişimi sağlanamamıştır. Ayrıca elde edilen A tipi kallusların alt kültür çalışmaları sonucunda da herhangi bir somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

**Çizelge 4.3.1.** Bisturi ile çiziler açılmış yaprak ayası eksplantlarının farklı büyüme düzenleyici madde içeren MS ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
MS-1	Aydınlık	9	22.22	0	100	77.77	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	6	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
MS-2	Aydınlık	11	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	10	0	0	0	50.00	50.00	0	0	0	0	0
MS-3	Aydınlık	10	30.00	0	100	70.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	13	92.30	0	100	0	7.69	100	0	0	0	0
MS-4	Aydınlık	10	70.00	0	100	30.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	13	92.30	0	100	7.69	0	100	0	0	0	0
MS-5	Aydınlık	5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	Karanlık	9	77.77	42.85	57.14	22.22	0	57.14	42.85	0	0	0
MS-6	Aydınlık	11	81.81	0	100	18.18	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	10	90.00	33.33	66.66	0	10.00	66.66	33.33	0	0	0
MS-7	Aydınlık	9	0	0	0	66.66	33.33	0	0	0	0	0
	Karanlık	10	70.00	0	100	0	30.00	100	0	0	0	0
MS-8	Aydınlık	7	42.85	0	100	57.14	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	8	75.00	0	100	0	25.00	100	0	0	0	0
MS-9	Aydınlık	6	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	8	100	0	100	0	0	100	0	0	0	0
MS-10	Aydınlık	8	62.50	0	100	37.50	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	8	100	25.00	75.00	0	0	75.00	25.00	0	0	0

**Çizelge 4.3.2.** Bisturi ile çiziler açılmış yaprak ayası eksplantlarının farklı büyüme düzenleyici madde içeren NN ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
NN-1	Aydınlık	10	40.00	0	100	50.00	10.00	100	0	0	0	0
	Karanlık	9	66.66	0	100	0	33.33	100	0	0	0	0
NN -2	Aydınlık	9	80.00	50.00	50.00	0	10.00	25.00	75.00	0	0	0
	Karanlık	7	71.42	0	100	28.57	0	100	0	0	0	0
NN -3	Aydınlık	7	71.42	0	100	28.57	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	10	80.00	0	100	0	20.00	100	0	0	0	0
NN -4	Aydınlık	8	62.50	0	100	12.50	25.00	100	0	0	0	0
	Karanlık	9	44.44	0	100	55.55	0	100	0	0	0	0
NN -5	Aydınlık	8	25.00	0	100	75.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	9	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
NN -6	Aydınlık	10	50.00	0	100	50.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	10	40.00	0	100	50.00	10.00	100	0	0	0	0
NN -7	Aydınlık	9	11.11	0	100	88.88	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	10	40.00	0	100	60.00	0	100	0	0	0	0
NN -8	Aydınlık	5	100	0	100	0	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	4	75.00	0	100	0	25.00	100	0	0	0	0
NN -9	Aydınlık	10	20.00	0	100	0	80.00	100	0	0	0	0
	Karanlık	9	44.44	0	100	55.55	0	100	0	0	0	0
NN -10	Aydınlık	9	44.44	0	100	55.55	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	9	66.66	0	100	33.33	0	100	0	0	0	0

Cork borer ile kesilen yaprak ayası eksplantlarından elde edilen bulgular ise Çizelge 4.3.3. ve 4.3.4.'de sunulmuştur. Araştırmada kullanılan ortamlar ile aydınlık ve karanlık uygulamaları incelendiğinde, MS ortamlarının tümünde karanlık uygulamaları, aydınlık uygulamalarına göre çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Buna göre en iyi sonucu %100'lük bir oranla MS 4 ve MS 5 ortamları göstermiştir. Aydınlık uygulamalarda ise yalnızca MS 4 (%30.00) ve MS 9 (%13.63) ortamlarında kallus oluşumu gözlenirken, bunlar dışındaki ortamlarda herhangi bir kallus oluşumu gözlenememiştir. NN ortamlarında ise yalnızca NN 6 karanlık uygulamasında kallus oluşmama ile birlikte, diğer ortam ve uygulamalarda farklı oranlarda kallus oluşumu saptanmıştır. En yüksek kallus oluşumu %83.33 ile NN 4 aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. A tipi kallus hiçbir NN ortamında ve uygulamalarında görülmezken, MS ortamlarından sadece MS 4 (%28.57) ve MS 3 (%27.58) karanlık uygulamalarında bulunmuştur.

Kuruyarak canlılığını kaybeden eksplantların oranı en fazla MS ortamlarında ve özellikle de aydınlık uygulamalarında tespit edilirken, NN ortamlarında bu oran ortamın içeriğine ve uygulanan kültür koşullarına göre farklılık göstermiştir. Canlılığını sürdüren fakat hiç kallus oluşturmayan eksplantların oranı (1 dereceli) MS ortamında en fazla %33.33, NN ortamında ise %25.00 olarak bulunmuştur. NN ortamlarında eksplantların tamamı tek taraflı yani 2 dereceli kallus oluştururken, MS ortamlarında ise çoğu ortam ve uygulamalarında eksplantların tamamı 2 dereceli kallus oluşturmuştur. 3 dereceli kallus yalnızca MS 4 (%28.57) ve MS 3 (%27.58) karanlık uygulamalarından elde edilmiştir.

Adventif sürgün oluşumu ise bisturi ile çiziler açılmış yaprak ayalarında olduğu gibi hiçbir uygulamadan elde edilememiştir. Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarından elde edilen A tipi kalluslardan da herhangi bir somatik embriyo oluşumu elde edilememiştir.

**Çizelge 4.3.3.** Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren MS ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

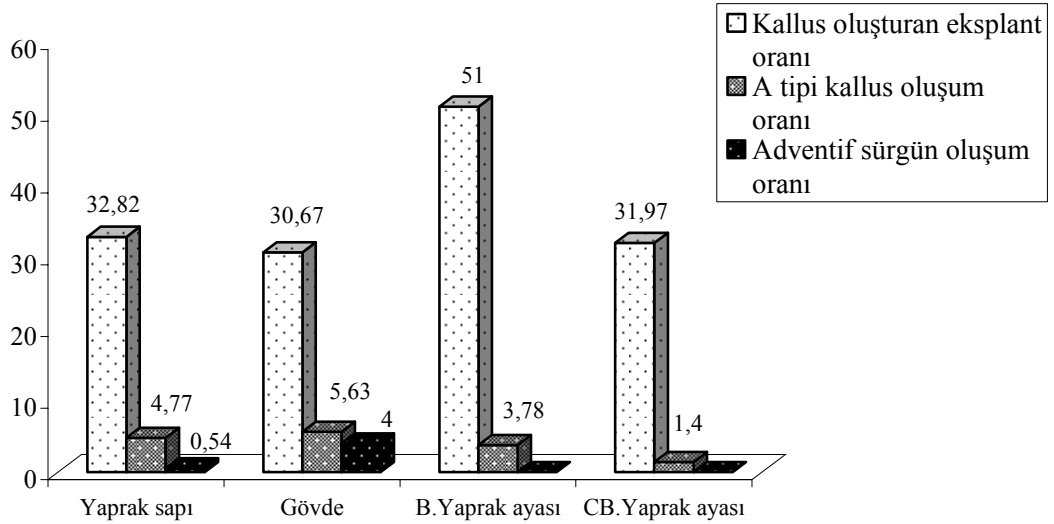
Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
MS-1	Aydınlık	10	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	30	16.66	0	100	50	33.33	100	0	0	0	0
MS-2	Aydınlık	30	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	30	0	0	0	66.66	33.33	0	0	0	0	0
MS-3	Aydınlık	30	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	30	96.66	27.58	72.41	0	3.33	72.41	27.58	0	0	0
MS-4	Aydınlık	10	30.00	0	100	70.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	28	100	28.57	71.42	0	0	71.42	28.57	0	0	0
MS-5	Aydınlık	30	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	10	100	0	100	0	0	100	0	0	0	0
MS-6	Aydınlık	10	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	10	70.00	0	100	0	30.00	100	0	0	0	0
MS-7	Aydınlık	7	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	25	16.00	0	100	56.00	28.00	100	0	0	0	0
MS-8	Aydınlık	32	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	28	7.14	0	100	67.85	25.00	100	0	0	0	0
MS-9	Aydınlık	22	13.63	0	100	86.36	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	29	62.06	0	100	37.93	0	100	0	0	0	0
MS-10	Aydınlık	21	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	17	52.94	0	100	47.05	0	100	0	0	0	0

**Çizelge 4.3.4.** Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarının farklı büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamlarında ve farklı kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Ortam no	Kültür Koşulları	Eksplant Sayısı	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kallus tipi (%)		Kallus oluşturma oranı (%)				Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
				A	B	0	1	2	3	Direkt	İndirekt	
NN-1	Aydınlık	20	5.00	0	100	95.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	21	23.80	0	100	76.19	0	100	0	0	0	0
NN -2	Aydınlık	20	50.00	0	100	90.00	10.00	100	0	0	0	0
	Karanlık	20	50.00	0	100	50.00	0	100	0	0	0	0
NN -3	Aydınlık	20	70.00	0	100	30.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	20	20.00	0	100	80.00	0	100	0	0	0	0
NN -4	Aydınlık	18	83.33	0	100	16.66	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	10	30.00	0	100	70.00	0	100	0	0	0	0
NN -5	Aydınlık	20	60.00	0	100	40.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	20	45.00	0	100	55.00	0	100	0	0	0	0
NN -6	Aydınlık	19	15.78	0	100	84.21	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	20	0	0	0	75.00	25.00	0	0	0	0	0
NN -7	Aydınlık	20	10.00	0	100	90.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	19	63.15	0	100	36.84	0	100	0	0	0	0
NN -8	Aydınlık	20	35.00	0	100	65.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	20	65.00	0	100	35.00	0	100	0	0	0	0
NN -9	Aydınlık	20	20.00	0	100	80.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	17	35.29	0	100	64.70	0	100	0	0	0	0
NN -10	Aydınlık	15	20.00	0	100	80.00	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	16	12.50	0	100	87.50	0	100	0	0	0	0

#### 4.4. Eksplant Tipinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri

Eksplant tipinin araştırmada incelenen kriterlerden kallus oluşturan eksplant oranı, A tipi kallus oluşum oranı ile adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri Şekil 4.4.1.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.4.1.** Eksplant tipinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri

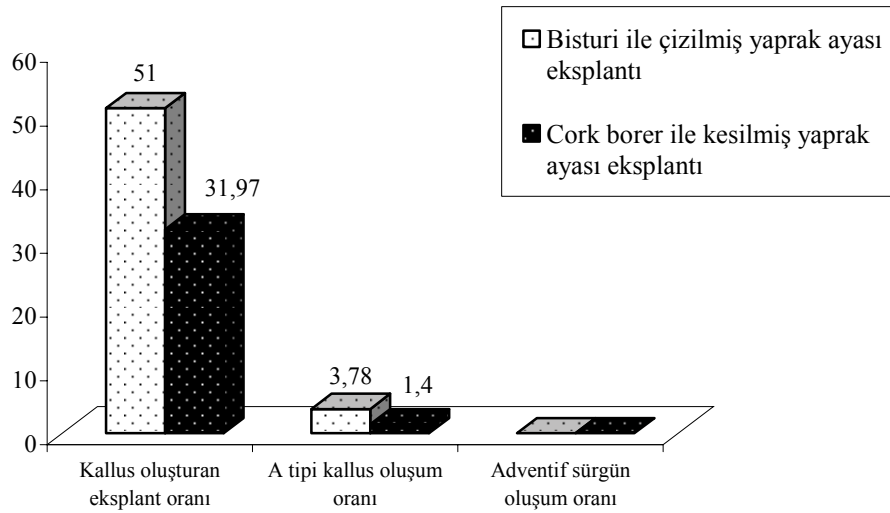
Buna göre kallus oluşturan eksplant oranının en yüksek olduğu eksplant %51.00 ile bisturi ile çizilmiş yaprak ayasında meydana gelirken, bunu sırasıyla %32.82 ile yaprak sapı, %31.97 ile cork borer ile kesilmiş yaprak eksplantları ve %30.67 ile gövde eksplantları izlemiştir

A tipi kallus oluşumunda ise, gövde eksplantı %5.63 ile en yüksek A tipi kallus oluşturan eksplant olarak belirlenirken, bunu sırasıyla %4.77 ile yaprak sapı, %3.78 ile bisturi ile çizilmiş yaprak ayası ve % 1.40 ile cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantı izlemiştir.

Adventif sürgün oluşturma oranı bakımından en iyi sonucu %4.00 ile gövde eksplantı verirken, bunu %0.54 ile yaprak sapı eksplantı izlemiştir. Bisturi ile çizilmiş ve cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarında ise herhangi bir adventif sürgün oluşumu meydana gelmemiştir.

#### 4.5. Yaprak Ayası Eksplantlarında Farklı Kesim Şekillerinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri

Yaprak ayası eksplantlarında farklı kesim şekillerinin araştırmada incelenen kriterlerden kallus oluşturan eksplant oranı, A tipi kallus oluşum oranı ile adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri Şekil 4.5.1.'de sunulmuştur.



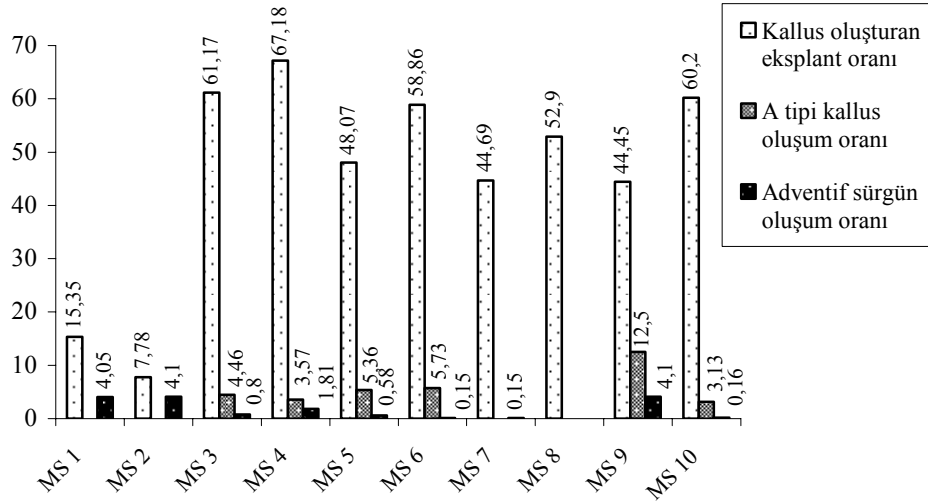
**Şekil 4.5.1.** Yaprak ayası eksplantında farklı kesim şekillerinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri

Buna göre kallus oluşturan eksplant oranı en yüksek %51.00 ile bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantında olurken, cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantında bu oran %31.97 olarak bulunmuştur.

A tipi kallus oluşum oranı bakımından yine bisturi ile çizilmiş yaprak ayası (%3.78), cork borer ile kesilmiş yaprak ayasına göre (%1.40) daha başarılı sonuç vermiştir. Adventif sürgün oluşumu bakımından ise ne bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantında ne de cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantında herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

#### 4.6. Besin Ortamlarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri

Farklı tip ve konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici madde içeren MS besin ortamlarının incelenen kriterlerden kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşum oranları üzerine etkileri Şekil 4.6.1.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.6.1.** MS besin ortamlarının kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşum oranı üzerine etkileri

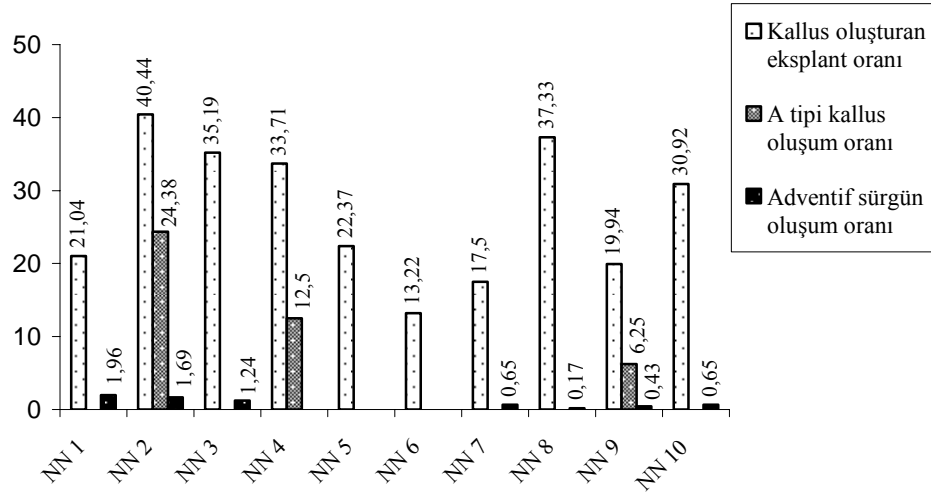
Temel besin ortamı olarak MS'in kullanıldığı besin ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranı %67.18 ile 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D içeren MS 4 ortamından elde edilirken, bu ortamı %61.17 ile 1 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D içeren MS 3 ve %60.20 ile 2 mg/l 2,4-D içeren MS 10 ortamları izlemiştir. En düşük kallus oluşum oranı ise 2 mg/l zeatin'nin ilave edildiği MS 2 ortamından elde edilmiştir.

A tipi kallus oluşumu ise en yüksek 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat katkılı MS 9 ortamında (%12.5) saptanırken; 2 mg/l BAP katkılı MS 1, 2 mg/l zeatin katkılı MS 2, 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 2.5 mg/l ABA + 1 g/l kazein hidrolizat katkılı MS 7 ve 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 2.5 mg/l ABA katkılı MS 8 ortamlarında A tipi kallus oluşumu elde edilememiştir.

MS besin ortamlarının adventif sürgün oluşumu üzerine olan etkileri incelendiğinde, 2 mg/l zeatin içeren MS 2 ve 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat

içeren MS 9 ortamları (%4.10) en yüksek adventif sürgün oluşumuna sahip ortamlar olurken, 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 2.5 mg/l ABA katkılı MS 8 ortamında ise herhangi bir adventif sürgün oluşumu elde edilememiştir.

Temel besin ortamı olarak NN'nin kullanıldığı ortamların araştırmada incelenen kriterler üzerine etkileri Çizelge 4.6.2'de sunulmuştur.



**Şekil 4.6.2.** Kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus oluşumu ve adventif sürgün oluşumunun NN besin ortamlarına göre değişimi

Farklı tip ve konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici madde içeren NN ortamlarından en yüksek kallus oluşum oranı %40.44 ile 2 mg/l zeatin içeren NN 2 ortamından elde edilmiştir. Buna karşın NN 6 ortamı %13.22 ile en düşük kallus oluşturan ortam olmuştur.

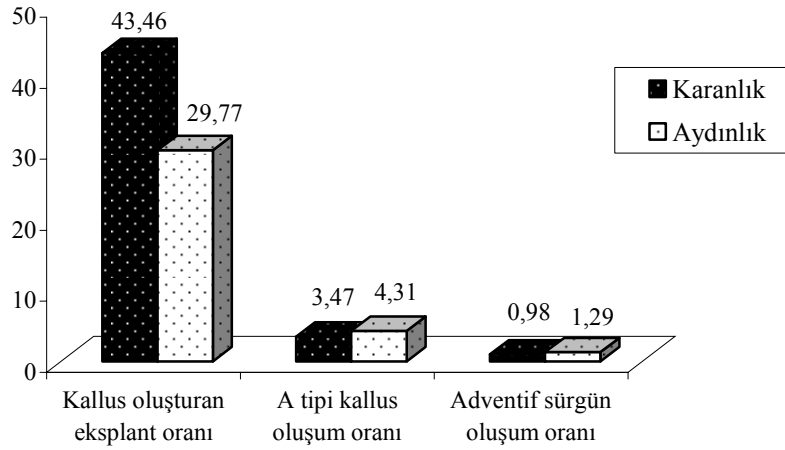
A tipi kallus oluşumu ise sadece 2 mg/l zeatin katkılı NN 2 (%24.38), 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D katkılı NN 4 (%12.5) ve 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat katkılı NN 9 (%6.25) ortamlarından elde edilirken, diğer ortamlarda A tipi kallus oluşumu gerçekleşmemiştir.

NN besin ortamlarının adventif sürgün oluşumu üzerine etkileri incelendiğinde ise en yüksek değer %1.96 ile 2 mg/l BAP içeren NN 1 ortamından elde edilirken, bunu sırasıyla %1.69 ile 2 mg/l zeatin katkılı NN 2 ve %1.24 ile 1 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D içeren NN 3 ortamları izlemiştir. 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D katkılı NN 4, 1 mg/l

BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat katkı NN 5 ve 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat katkı NN 6 ortamlarından ise adventif sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir.

#### 4.7. Kültür Koşullarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı ile A Tipi Kallus ve Adventif Sürgün Oluşum Oranları Üzerine Etkileri

Tamamen karanlık koşullar ile gün uzunluğu 16 h ve ışıklanma şiddeti 2000-2200 lux olan aydınlık koşullarda kültüre alınan eksplantlarda araştırmada incelenen kriterler bakımından elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.1.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.7.1.** Işıklanma rejimlerinin kallus oluşturan eksplant oranı ile A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkileri

Buna göre kallus oluşturan eksplant oranı %43.46 ile sürekli karanlık koşullarda kültür edilen eksplantlarda daha fazla olurken, 16 h aydınlık 8 h karanlık koşullarda kültür edilen eksplantlarda bu oran %29.77 olmuştur.

A tipi kallus oluşumu %4.31 ile aydınlık koşullarda kültür edilen eksplantlarda daha yüksek oranda gözlenirken, sürekli karanlıkta kültür edilen eksplantlarda ise bu oran %3.47 olarak saptanmıştır.

Adventif sürgün oluşum oranları incelendiğinde aydınlık koşullarda kültür edilen eksplantlar (%1.29), sürekli karanlık koşullarda kültür edilen eksplantlara (%0.98) göre daha başarılı bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir yüksek lisans tezi olarak sunulan ve asmada farklı eksplantların *in vitro* rejenerasyonlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu araştırmada, bitkisel materyal olarak Kalecik karası şaraplık üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden elde edilen yaprak sapı ve gövde eksplantları ile iki farklı kesim şekli uygulanan yaprak ayaları kullanılmıştır. Araştırma, eksplant tipleri, besin ortamları, büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonu ile kültür koşullarının, *in vitro*'da kallus oluşturan eksplant oranı, A tipi kallus oluşum oranı, kallus oluşturma oranı (0-1-2-3 dereceli) ve adventif sürgün oluşum oranları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Kallus oluşturan eksplant oranı, A tipi kallus oluşum oranı, kallus oluşturma oranı (0-1-2-3 dereceli) ve adventif sürgün oluşum oranları bakımından elde edilen araştırma sonuçları değerlendirildiğinde araştırmada incelenen kriterlerin eksplant tiplerine göre büyük ölçüde değiştikleri saptanmıştır. Kallus oluşturan eksplant oranı bakımından en yüksek değerler bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantlarından elde edilirken, A tipi kallus ve adventif sürgün oluşum oranı bakımından gövde eksplantlarının daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır. Yaprak eksplantları arasında da yaprak sapsarı, yaprak ayalarına göre A tipi kallus oluşum oranı ile adventif sürgün gelişimi bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu durum, Cheng ve Reisch (1989), Göktürk Baydar (2000), Gök Tangolar (2002) ve Göktürk Baydar ve Çetin (2003) tarafından da bildirilmiştir. Kültüre alınan eksplant tipine göre *in vitro*'da elde edilen başarının değiştiği daha önce bu alanda yapılan pek çok araştırma ile de belirlenmiştir (Stamp ve ark., 1990; Mhatre ve ark., 2000; Göktürk Baydar ve Çetin, 2003; Jayasankar ve ark., 2003).

Yaprak ayalarının kesim şekli de araştırmadan elde edilen sonuçlar üzerinde etkili olmuştur. Kallus oluşturan eksplant oranı ve A tipi kallus oluşumu bakımından bisturi ile çizilmiş yaprak ayasının, cork borer ile kesilmiş yaprak ayasına göre daha başarılı bulunduğu belirlenmiştir. Matsuta ve Hirabayashi (1989) cork boreri

kullanmışlar, Stamp ve ark. (1990a)'da yaralanmış yaprak eksplantlarını kullanmışlardır.

Eksplant tiplerinin yanı sıra eksplantların alındıkları ana bitkilerin yetiştikleri ortam şartları da eksplantların *in vitro* rejenerasyon kapasiteleri üzerine oldukça etkili olmaktadır. *In vitro*'da yetişen bitkilerden alınan eksplantların çok daha başarılı olduklarının belirlenmesi üzerine, araştırmada kontrollü koşullarda yetişen bitkilerden alınan eksplantlar kullanılmıştır. Nitekim *in vivo* ve *in vitro*'da yetiştirilen bitkiciklerden alınan eksplantları kullanan Clog ve ark. (1990) da *in vitro*'da yetiştirilen bitkiciklerden alınan eksplantların *in vitro* koşullarda daha iyi rejenere olduğunu belirtmiş ve bunun nedeninin de *in vivo*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması ve doku zararlanmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar Gök Tangolar (2002) da *in vitro* da yetiştirilen bitkiciklerden alınan yaprak eksplantların, bağdan alınanlara göre *in vitro* koşullarda daha başarılı sonuçlar vermesiyle elde edilmiştir.

Besin ortamları ve besin ortamlarına katılan büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonlarının yaprak ayası, yaprak sapı ve gövde eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon yeteneklerine olan etkilerinin de incelendiği araştırmada, elde edilen bulguların besin ortamlarına ve kullanılan büyüme düzenleyici madde tip ve konsantrasyonlarına göre değiştiği tespit edilmiştir.

MS ve NN olmak üzere iki farklı temel besin ortamının kullanıldığı bu araştırmada, her bir temel besin ortamı için 10'ar tane olmak üzere farklı tip ve konsantrasyonda büyümeyi düzenleyici madde içeren toplam 20 farklı besin ortamı ve karanlık-aydınlık olmak üzere iki farklı kültür koşulunun eksplantların *in vitro* koşullarda göstermiş oldukları gelişme üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda eksplantların gelişme durumları, kullanılan besin ortamlarına göre değişmiştir. Eksplant tiplerine göre değişmekle birlikte, eksplantlar kültüre alındıkları bazı ortamlarda herhangi bir gelişme gösterememişlerdir. Nitekim karanlık koşullarda kültüre alınan yaprak sapı eksplantları 10 no'lu NN ortamında, aydınlık koşullarda kültüre alınan bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantlarında 2 ve 9 no'lu MS

ortamları ile karanlıkta kültüre alınan 5 no'lu NN ortamında ve aydınlık koşullarda kültüre alınan cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantlarında 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 ve 10 no'lu MS ortamlarında eksplantların dikimi takip eden ilk 20 gün içerisinde kuruyarak canlılıklarını yitirdikleri tespit edilmiştir. Diğer taraftan canlılıklarını sürdüren eksplantlar da ise, 4 haftalık gelişme sonunda adventif sürgün ya da kallus oluşumu gözlenmiştir. Besin ortamlarının içeriğine göre elde edilen kallusların renk, yapı ve görünüşlerinde de farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bazı ortamlarda sarımsı-kahverengi ya da kahverenginin değişik tonlarında, sulu, yumuşak ve sağlıklı görünümüne sahip kalluslar (B tipi) elde edilmiştir. Kalluslarda görülen bu tip kahverengileşmenin nedeninin kültüre alınan asma eksplantlarının yüksek miktarda fenolik bileşik üretmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Jayasankar ve ark., 1999; Gök Tangolar, 2002).

Araştırmada A tipi kallus oluşum oranı olarak ifade edilen ve embriyogenik yapılar oluşturabilme bakımından daha ümitvar özellikler taşıyan beyaz, sert, kırılabilir yapıda kalluslar da elde edilmiştir. Bu kalluslar besin ortamı tipine göre farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda 2,4-D, BAP ve kazein hidrolizat içeren 3, 4, 5, 6 ve 9 no'lu MS ve 4 ile 9 no'lu NN ortamları ile yalnızca 2,4-D içeren 10 no'lu MS ortamından ve yalnızca zeatin içeren 2 no'lu NN ortamından elde edilmişlerdir. Bu ortamlardan elde edilen A tipi kalluslar daha sonra somatik ya da adventif yapılar oluşturmak üzere kültüre alındıkları 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ve 1 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BAP içeren NN ortamında 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır. Bu süre sonunda kalluslar aynı kompozisyona sahip taze besin ortamlarında alt kültüre alınmışlar; ancak alt kültürler sırasında kallusların hiçbirinde ne adventif yapı ne de somatik embriyo oluşumu gerçekleştirilememiştir. Birinci alt kültürden itibaren kallusların bir kısmı hacim olarak büyüme göstermesine karşın, ilerleyen alt kültürler sonunda tekrar alt kültüre almaya uygun kallus bulunamamıştır. Bu süre sonunda, bütün kallusların canlılıklarını yitirmeleri nedeniyle kültüre son verilmiştir.

Araştırmada iki farklı temel besin ortamı kullanılmış olup, elde edilen sonuçların bu iki farklı tipteki ortama göre büyük ölçüde değiştikleri saptanmıştır. Nitekim kallus oluşturan eksplant oranı ile adventif sürgün oluşum oranı bakımından MS besin

ortamı daha iyi sonuç verirken, A tipi kallus oluşum oranı bakımından NN ortamının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde Gök Tangolar (2002), adventif göz oluşumu üzerine MS besin ortamının NN ve B5 ortamlarına göre daha başarılı sonuçlar verdiğini tespit etmiştir. Kullanılan besin ortamlarının *in vitro* kültürde sonucu etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğu daha önce Stamp ve Meredith (1988), Matsuta ve Hirabayashi (1989), Göktürk Baydar (2000) ve Göktürk Baydar ve Çetin (2003) tarafından da belirtilmiştir.

Besin ortamları içerisine konulan büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonları da kültürün başarısını etkileyen faktörler içerisinde yer almaktadır. Bu çalışmada BAP, 2,4-D, zeatin, kazein hidrolizat ve ABA'in farklı konsantrasyonları denenmiş olup, bu maddelerin eksplantların gelişimi üzerine etkilerinin oldukça değişken olduğu belirlenmiştir. Örneğin kallus oluşum oranı bakımından BAP ve 2,4-D içeren 4 no'lu MS ortamı ile yalnızca zeatin içeren 2 no'lu NN ortamı iyi sonuçlar verirken, adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçlar yalnızca zeatin içeren 2 no'lu MS ile BAP, 2,4-D ve kazein hidrolizat içeren 9 no'lu MS ortamından ve yalnızca BAP içeren 1 no'lu NN ortamından elde edilmiştir. Büyümeyi düzenleyici maddelerin eksplantların *in vitro* gelişmelerine olan etkileri üzerine araştırma yapan Goebel Tourand ve ark. (1993) çalışmalarında zeatin ve BAP'in embriyo morfolojisinin gelişmesini teşvik ettiğini aynı zamanda bu maddelerin anormal oluşum oranını artırdığını ve bitkiye dönüşüm oranının artmasında da etkisiz olduğunu belirlemişlerdir. Yine bir diğer çalışmada Stamp ve ark. (1990b), adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçları 2 mg/l BAP içeren ortamlardan elde edildiğini belirlemişlerdir. Matsuta ve Hirabayashi (1989), Perrin ve ark. (2001), Martinelli ve ark. (2003), Leal ve ark. (2004), Morgana ve ark. (2004) ile Carimi ve ark. (2005) da araştırmalarında farklı büyümeyi düzenleyici maddeler içeren besin ortamlarını kullanmışlar, bu maddelerin eksplantların *in vitro* gelişmelerinde oldukça önemli olduklarını ve kültürde eksplant gelişimlerinin yönünü belirlediklerini vurgulamışlardır.

Araştırmada karanlık ve aydınlık olmak üzere farklı iki kültür koşulu denenmiştir. A tipi kallus oluşum oranı bakımından aydınlık kültür koşullarının daha iyi sonuç

verdiği tespit edilmiştir. Direkt adventif sürgün oluşum oranı bakımından aydınlıkta kültüre alınan eksplantlarda daha yüksek sonuçlar elde edilirken, indirekt adventif sürgün oluşumunda ise karanlık kültür koşulları daha iyi sonuç vermiştir. Kallus oluşturan eksplant oranı bakımından ise karanlık koşullar daha olumlu olup, benzer şekilde Gök Tangolar (2002) da 41 B asma anacına ait yaprak sapı eksplantlarından en yüksek kallus oluşturan eksplant oranlarını karanlıkta kültüre aldıkları eksplantlardan elde ettiklerini belirtmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlar kısaca değerlendirildiğinde gövde eksplantları A tipi kallus ve adventif sürgün gelişimi bakımından en iyi sonuçları verirken; ortamlar içinde A tipi kallusların da en fazla 2 mg/l zeatin katkılı NN 2 ortamından, adventif sürgün gelişimi de 2 mg/l zeatin içeren MS 2 ve 0.2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat içeren MS 9 ortamlarından elde edildiği belirlenmiştir. Yaprak ayalarına uygulanan kesim şekillerinden bisturi ile çizilmiş yaprak ayası kallus oluşum oranı ve A tipi kallus oluşum oranı bakımından cork borer ile kesilenlere göre daha başarılı sonuçlar verirken; adventif sürgün gelişimi her iki uygulamada da elde edilememiştir. Karanlık koşullar ise kallus oluşumu ve indirekt adventif sürgün oluşumu üzerinde olumlu etkilerde bulunurken; 16/8 h ışıklandırmanın A tipi kallus ve direkt adventif sürgün gelişimini artırdığı tespit edilmiştir. Cork borer ile kesilmiş yaprak ayası eksplantı için 4 no'lu MS ve NN ortamları en iyi sonucu verirken, yaprak sapı, gövde ve bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantı için 2 no'lu NN ortamı başarılı bulunmuştur. MS ortamlarındaki başarı durumu eksplantlara göre farklılık göstermiştir. Örneğin, yaprak sapı eksplantı için 3 no'lu, gövde eksplantı için 9 no'lu ve bisturi ile çizilmiş yaprak ayası eksplantı için ise 6 no'lu MS ortamları genel olarak en iyi sonuçları vermiştir.

Asmada farklı eksplantların *in vitro* rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi üzerine gerçekleştirilen bu proje sonucunda eksplant tipi, besin ortamları ve bu ortamlara ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonları ile kültür koşullarına bağlı olarak kallus oluşumu, A tipi kallus oluşumu ile direkt ve indirekt olmak üzere adventif sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bununla birlikte herhangi bir somatik embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Somatik embriyo oluşumu, tür ve çeşide bağlı olarak gerçekleşen oluşumlar olup, her genotipin embriyogenik

yapılar oluşturma kapasiteleri birbirinden farklı olmaktadır. Araştırmamızda kullanılan üzüm çeşidinin kullanıldığı bir diğer araştırmada (Göktürk Baydar ve Çetin, 2003) da benzer şekilde somatik embriyo oluşumunun gözlenememiş olması bu sonucu doğrulamaktadır. Nitekim bu konuda yapılan diğer pek çok araştırmada somatik embriyo oluşumunun gerçekleştirilemediği pek çok genotip bulunmaktadır (Hollo ve ark., 2000; Perrin ve ark., 2001; Gök Tangolar, 2002). Araştırmamızda adventif sürgün gelişimi ile bitki oluşumu gerçekleşmiş olup, bu tip rejenerasyon da moleküler genetik metotlarının ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanabilmesi bakımından önem taşımaktadır. Çünkü bu çalışmalarda başarı her şeyden önce ıslah materyali olarak kullanılan bu bitki parçacıklarının *in vitro* koşullarda tam bitkiye dönüşümlerinin sağlanması ile mümkün olabilmektedir. Ancak somatik embriyo gelişiminin sağlanamamış olması, asmada farklı eksplant tipleri, besin ortamları ve kültür koşulları denenerek etkin bir somatik embriyogenensisle bitki oluşum protokolünün geliştirilmesi gerçeğini de ortaya koymaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Altun, O., Yürekli, A.K., 2000. *Vitis vinifera L. cv. Sultani (Vitaceae)*'de *In Vitro* Kalsiyum Değişiminin Kallogenez ve Regenerasyon Üzerine Etkisi. BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(1), 4-12.
- Carimi, F., Barizza, E., Gardiman, M., Schiavo, F.L., 2005. Somatic Embryogenesis from Stigmas and Styles of Grapevine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41(3), 249-252.
- Cheng, Z.M., Reisch, B.I., 1989. Shoot Regeneration from Petioles and Leaves of *Vitis labruscana* Catawba. *Plant Cell Reports*, 8(7), 403-406.
- Clog, E., Bass, P., Walter, B., 1990. Plant Regeneration by Organogenesis in *Vitis* Rootstock Species. *Plant Cell Reports*, 8(12), 726-728.
- Colby, S.M., Juncosa, A.M., Stamp, J.A., Meredith, C.P., 1992. Developmental Anatomy of Direct Shoot Organogenesis from Leaf Petioles of *Vitis vinifera (Vitaceae)*. *Amer. J. of Botany*, 78(2), 260-269.
- Compton, M.E. ve Gray, D.J., 1996. Effects of Sucrose and Methylglyoxal Bis-(Guanylhidrazone) on Controlling Grape Somatic Embryogenesis. *Vitis*, 35(1), 1-6.
- Çelik, H. 2002. Üzüm Çeşit Katoloğu. Sun Fidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 2. Evren Ofset A.Ş. Veb. Ofset Tesisleri, 137 s.
- Büyükdemirci, H., 1997. *In vitro* Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves and Axillary Buds of Grapevine (*Vitis spp.*). Fac. of the Graduate Col. at the Univ. of Nebraska (Yüksek Lisans Tezi), 122 s.
- Emershad, R.L., Ramming, D.W., 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera L.*). *Plant Cell Reports*, 14(1), 6-12.
- Goebel Tourand, I., Mauro, M.C., Sossountzov, L., Miginiac, E. ve Deloire, A., 1993. Arrest of Somatic Embryo Development in Grapevine: Histological Characterization and The Effect of ABA, BAP and Zeatin in Stimulating Plantlet Development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 91-103.
- Göktürk Baydar, N., Çelik, H., 1999. Asmada (*Vitis vinifera L.*) Sürgün Ucu Kaynağının *In Vitro* Mikroaşılama Başarı Üzerine Etkileri. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23(3), 741-747.
- Göktürk Baydar, N., 2000. Asmada (*Vitis spp.*) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. *Turk J. Biol.*, 24, 645-656.

- Göktürk Baydar, N., Çetin, S., 2003. Asma Yaprak Eksplantlarının *In Vitro* Gelişmeleri Üzerine Genotip, Eksplant Tipi ve Besin Ortamlarının Etkileri. 13. Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı, 99-104, Çanakkale.
- Gök Tangolar, S. 2002. Asmalarda Somatik Embriyogenesis ve Organogenesis Yoluyla Bitki Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 165 s., Adana.
- Harst, M., 1995. Development of a Regeneration Protocol for High Frequency Somatic Embryogenesis from Explants of Grapevines (*Vitis spp.*). *Vitis*, 34(1), 27-29.
- Heloir, M.C., Fournioux, J.C., Oziol, L., Bessis, R., 1997. An Improve Procedure for the Propagation *In Vitro* of Grapevine (*Vitis vinifera cv. Pinot noir*) Using Axillary Bud Microcuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 49, 223-225.
- Hollo, R., Misik, S., Bouquet, A(ed)., Boursiquot, J.M., 2000. Investigation of grape anther culture aiming haploid plant production. *Acta Hort.*, 528, 347-350.
- Jayasankar, S., Gray, D.J., Litz R.Z., 1999. High Efficiency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Grapevine. *Plant Cell Reports*, 18, 533-537.
- Jayasankar, S., Bondada, B.R., Zhijian, L. ve Gray, D.J., 2003. Comparative Anatomy and Morphology of *Vitis vinifera (Vitaceae)* Somatic Embryos from Solid-and Liquid Culture Derived Proembryogenic Masses. *American Journal of Botany*, 90 (7), 973-979.
- Kikkert, J.R., Striem, M.J., Vidal, J.R., Wallace, P.G., Barnard, J., Reisch, B.I., 2005. Long Term Study of Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of 12 Grapevine (*Vitis spp.*) Genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41(3), 232-239.
- Leal, F., Pinto-Carnide, O., Guedes-Pinto, H., Pais, M.S., 2004. Embryogenesis and Plant Regeneration in *Vitis vinifera L.* by Anther Culture. *ISHS Acta Horticulturae* 652, I. International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research, Lisbon, Portugal.
- Martinelli, L., Bragagna, P., Poletti, V., Scienza, A., 1993. Somatic Embryogenesis from Leaf and Petiole Derived Callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Reports*, 12, 207-210.
- Martinelli, L., Poletti, V., Bragagna, P., Poznanski, E., 1996. A Study on Organogenic Potential in the *Vitis* Genus. *Vitis*, 35(4), 159-161.

- Martinelli, L., Gribaudo, I., Semenzato, M., Poletti, V., 2003. ovary as valuable explant for somatic embryogenesis induction in grapes (*Vitis spp.*). ISHS Acta Horticulturae 603, VIII. International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2(111), Kecskemet, Hungary.
- Matsuta, N., Hirabayashi, T., 1989. Embryogenic Cell Lines from Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Reports, 7, 684-681.
- Matsumoto, T., Sakai, A., 2003. cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro grown grape (*Vitis*) by a two step vitrification protocol. Euphytica, 131, 299-304.
- Mhatre, M., Salunkhe, C.K., Rao, P.S., 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. Towards an Improved Protocol. Scientia Horticulturae, 84, 357-363.
- Morgana, C., Di Lorenzo, R., Carimi, F., 2004. Somatic Embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sograone) from Stigma and Style Culture. Vitis Journal of Grapevine Research, 43(4), 169-173.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. Arevised Medium for Rapid Growth Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Phsysiol. Plant, 15, 473-479.
- Nakano, M., Sakakibara, T., Watanabe, Y., Mii, M., 1997. Establishment of Embryogenic Cultures in Several Cultivars of *Vitis vinifera* and *V. x labruscana*. Vitis, 36(3), 141-145.
- Nakajima, I., Matsuta, N., 2003. Somatic Embryogenesis from Filaments of *Vitis vinifera* L. and *Vitis labruscana* Bailey. Vitis, 42 (1), 53-54.
- Nitsch, J. ve Nitsch, C., 1969. Haploid Plants from Pollen Grains. Science, 163, 85-87.
- Perl, A., Saad, S., Sahar, N., Holland, D., 1995. Establishment of Long Term Embryogenic Cultures of Seedless *Vitis vinifera* Cultivars a Synergistic Effect of Auxins and the Role of Abscisic Acid. Plant Science, 104, 193-200.
- Perrin, M., Martin D., Joly D., Demangeat, G., This, P., Masson, J.E., 2001. Medium-Dependent Response of Grapevine Somatic Embryogenic Cells. Plant Science, 161, 107-116.
- Popescu, C.F., 1996. Somatic Embryogenesis and Plant Development from Anther Culture of *Vitis vinifera*. Plant Growth Regulation, 20(1), 75-78.
- Rajasekaran, K., Mullins, M.G., 1981. Organogenesis in Internode Explants of Grapevines. Vitis, 20, 218-227.

- Salunkhe, C.K., Rao, P.S., Mhatre, M., 1997. Induction of Somatic Embryogenesis and Plantlets in Tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports*, 17, 65-67.
- Scorza, R., Corts J.M., Gray, D.J., Gonsalves, D., Emershad, R.L., Ramming, D.W., 1996. Producing Transgenic Thompson Seedless Grape (*Vitis vinifera* L.) Plants. *J. Amer. Soc. Horst. Sci.*, 121(4), 616-619.
- Stamp, J.A., Meredith, C.P., 1988. Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35, 235-250.
- Stamp, J.A., Colby, S.M., Meredith, C.P., 1990a. Improved Shoot Organogenesis from Leaves of Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115(6), 1038-1042.
- Stamp, J.A., Colby, S.M., Meredith, C.P., 1990b. Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Grape (*Vitis spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22, 127-133.
- William, E.G., Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.*, 57, 443-462.
- Thomas, P., 2000. Microcutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61, 189-198.
- Thomas, P. 2001. Leaf number and position effects on the survival and performance of grape microcuttings *in vitro*, and the sensitivity of the cut nodal region to the medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 65, 129-139.
- Torregrosa, L., Torres-Vials, M., Bouquet, A., 1995. Somatic Embryogenesis from Leaves of *Vitis X Muscadinia* Hybrids. *Vitis*, 34(2), 239-240.
- Youngju, K., Changhoo, L., Namin, H., 2001. Effects of Medium Composition and Culture Condition on Plant Regeneration via Organogenesis of Kyoho Grape. *Hort. Abstr.*, 71(1), 172.
- Zhu, Y.M., Hoshiro, Y., Nakano, M., Takahashi, E., Mii, M., 1997. Highl Efficient System of Plant Regeneration from Protoplasts of Grapevine (*Vitis vinifera* L. ) Through Somatic Embryogenesis by Using Embryogenic Callus Culture and Activated Charcoal. *Plant Science*, 123, 151-157.
- Zlenko, V.A., Kotikov, I.V., Troshin, L.P., 2002. Efficient GA<sub>3</sub> Assisted Plant Regeneration from Cell Suspensions of Three Grape Genotypes Via Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3), 295-299.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : Zehra BABALIK

**Doğum Yeri** : Samsun

**Doğum Yılı** : 1980

**Medeni Hali** : Evli

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

**Lise** : 1994–1998 Alanya Lisesi/Süper Lise

**Lisans** : 1998–2002 Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

**Yabancı Dil** : İngilizce

### **İş Deneyim :**

2004 yılından beri Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.