

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ülkü İNCEOĞLU

**BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA KÖK EKSPLANTLARINDAN
BİTKİ REJENERASYONUNUN OPTİMİZASYONU**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA KÖK EKSPLANTLARINDAN BİTKİ
REJENERASYONUNUN OPTİMİZASYONU**

Ülkü İNCEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile
Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ Prof. Dr. Nihal BUZKAN
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’ nda Hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2012YL28**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TURUNÇGİL ANAÇLARINDA KÖK EKSPLOANTLARINDAN BİTKİ REJENERASYONUNUN OPTİMİZASYONU

Ülkü İNCEOĞLU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Yıl : 2013, Sayfa: 67

Jüri : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ

: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Bu tez çalışmasında, dört farklı turunçgil anacının (Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 turuncu, Gou Tou turuncu, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarinini) *in vitro*'da çimlendirilen tohumlarından gelişen kök eksplantları kullanılarak kökten bitki rejenerasyonunun optimizasyonu hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan turunçgil genotiplerine ait kök eksplantları BA ve NAA' m 21 farklı konsantrasyonunu içeren besi ortamında kültüre alınmışlardır. Çalışma sonucunda kök eksplantlarından en yüksek kallus oluşum oranı sırasıyla 0.5 mg/L BA içeren MS ortamında Carrizo sitranjında (% 90.73), Tuzcu 31-31 turuncunda (% 83.33) ve Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininde (% 62.87) sağlanmıştır. Gou Tou turuncunda ise kallus oluşum oranı % 58.33 olarak belirlenmiştir. Rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus (kaliteli kallus) oranlarına bakıldığında en yüksek başarı Carrizo sitranjında (% 88.09), daha sonra Tuzcu 31-31 genotipinde (% 25.95) sağlanmıştır. En düşük oran ise Gou Tou turuncunda (% 2.75) bulunmuştur. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininde sonuç alınamamıştır. Sürgün oluşum oranlarına bakıldığında Carrizo sitranjı en başarılı genotip olarak belirlenmiştir (% 60.95). Carrizo sitranjında 0.5 mg/L BA, 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA içeren MS ortamlarında %100 başarı elde edilmiştir. Gou Tou turuncunda sürgün başarı oranı % 0.23 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, Rejenerasyon, Anaç, Sürgün

ABSTRACT

MSc THESIS

OPTIMIZATION OF PLANT REGENERATION FROM ROOT EXPLANTS AT SOME CITRUS ROOTSTOCKS

Ulku INCEOGLU

UNIVERSITY OF CUKUROVA
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KACAR

Year: 2013, Pages: 67

Jury : Prof. Dr. Yıldız AKA KACAR

: Prof. Dr. Yesim YALCIN MENDI

: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

. In this thesis, root explants; *Citrus sinensis* L Osb. x*Poncirus trifoliata* L Raf. (cv ‘ Carrizo Citrange’)*Citrus aurantium* L. (cv ‘ Tuzcu 31-31’)*Citrus aurantium* L. (cv ‘ Gou Tou’)*Citrus reshni* Hort. Ex. Tan.(cv ‘ Tuzcu Cyprus Cleopatra Mandarin’) obtained from germinated seeds of four different citrus rootstock were used to optimize plant regeneration from root explants. Root explants belonging to citrus genotypes used in the present study were cultured in media supplemented with 21 different concentration of BA and NAA. From the results of study, the highest value of callus was determined from MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA. in Carrizo Citrange 90.73%, in Tuzcu 31-31 Sour Orange 88.33%, in Tuzcu Cyprus Cleopatra Mandarin 62.87%, in Gou Tou Sour Orange 58.33%. The highest quality callus rates were observed and the highest success was obtained in Carrizo Citrange with 88.09%, and then in Tuzcu 31-31 with 25.95%. The lowest rate was determined in Gou Tou Sour Orange with 2.75%. No any observed in Tuzcu Cyprus Cleopatra Mandarin. In view of shoot formation rates, Carrizo Citrange identified as the most successful genotype (60.95%). In Carrizo Citrange, MS media supplemented with 0.5 mg/L BA, 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA showed 100% success based on the shoot formation. In Gou Tou Sour Orange, shoot success rate was determined as 0.23%.

Keywords:Citrus, Regeneration,Rootstock, Shoot

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğretimine geri dönme kararımın sonra; her konuda beni destekleyen, kararlılığıyla engelleri aşabileceğime inandıran, çalışmalarımın başlatılmasında, yürütülmesinde , Bitki Biyoteknolojisi konusunda bilgilenmemde ve her şeyden önemlisi; içimde bir ukte olarak kalan Yüksek Lisans tamamlama hayalimi gerçeğe dönüştürmemi sağlayan **Değerli Danışman Hocam Sayın Prof.Dr.Yıldız AKA KAÇAR’ a sonsuz minnet, sevgi ve saygılarımla...**

Tezimde kullanılacak anaçların belirlenmesinde, kullandığım materyallerin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen **Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU’ na saygılarımla...**

Yardıma başvurduğum her anda bana destek olan hocam **Sayın Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ’ yşükranlarımla...**

Bitki Biyoteknolojisi'ni öğrenme, tezimin belirlenmesi, yürütülmesi, tamamlanması, yazılması aşamalarında sabırla yetismeme yardımcı olan; bitmeyen sorularımı, bıkmadan cevaplayıp, yardım ve desteklerini esirgemeyen; istatistik analizlerimi yapan **Biyolog Özhan ŞİMŞEK, Biyolog Dicle DÖNMEZ ve Biyolog Melda BONCUK’ a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle...**

Yüksek Lisans öğretimine başladığım ilk günden itibaren her konuda yardımlarını esirgemeyen **Bitki Koruma Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU’ na teşekkürlerimle...**

Ders aşamasında ve tez çalışmalarım; görevimle, üniversite çalışmalarımı birlikte yürütebilmem için her türlü kolaylığı sağlayan **Seyhan Cumhuriyet Ortaokulu Müdürü Sayın Mustafa ÖZKAN’ a sonsuz saygılarımla...**

Ve son olarak çalışmalarımı düzenli yürütebilmem ve başarmam için her türlü fedakarlığı yapan; yeri geldiğinde sorumluluklarımı üstlenen; her konuda yardım ve destekte bulunan **Değerli Eşim Mustafa; Canım Kızım Bilge ve Canım Oğlum Mert’ e sonsuz sevgilerimle...**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Turunçgillerde Yapılan Rejenerasyon Çalışmaları	8
2.2. Diğer Bitkilerde Yapılan Rejenerasyon Çalışmaları.....	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. MATERYAL	15
3.1.1 Bitkisel Materyal.....	15
3.1.2 Besin Ortamı.....	18
3.2. METOD	20
3.2.1. Tohum Örneklerinin Alınması	20
3.2.2. Tohumların Sterilizasyonu	20
3.2.3. Tohumların Kültür Ortamına Aktarılması	21
3.2.4. Kök Eksplantlarından Bitki Rejenerasyonu Denemesinin Kurulması..	22
3.2.5.Kök Eksplantlarından Oluşan Sürgünlerden Bitkiciklerin Elde Edilmesi	25
3.2.6. İstatistik Analizler	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1. Genotiplerde Kallus Oluşumu.....	27
4.1.1. Carrizo Sitranjı Genotipinde Kallus Oluşumu..	27
4.1.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Kallus Oluşumu.....	31
4.1.3. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarininde Kallus Oluşumu..	34
4.1.4. Gou Tou Genotipinde Kallus Oluşumu	37

4.2. Genotiplerde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları	40
4.2.1. Carrizo Sitranjı Genotipinde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları.....	40
4.2.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları.....	42
4.2.3. Gou Tou Genotipinde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları	44
4.2.4. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarininde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları..	45
4.3. Genotiplerde Sürgün Oluşturma	46
4.3.1. Carrizo Genotipinde Sürgün Oluşumu.....	47
4.3.1.1. Carrizo Sitranjı Genotipinde Direk Ve İndirek Oluşan Sürgünler	49
4.3.1.2. Carrizo Sitranjı Genotipinde Rejenerasyonla Oluşan Sürgünlerden Elde Edilen Bitkicikler	50
4.3.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Sürgün Oluşumu..	52
4.3.3. Gou Tou Genotipinde Sürgün Oluşumu..	53
4.3.4. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarininde Sürgün Oluşumu..	53
4.4. Kökten Bitki Rejenerasyonu Deneme Sonuçları	54
4.4.1. Genotiplerde Kallus Oluşum Oranlarının Değerlendirilmesi..	54
4.4.2. Genotiplerde Rejenerasyon Oluşturma Kapasitesine Sahip Kallus Oranlarının Değerlendirilmesi..	55
4.4.3. Genotiplerde Sürgün Oluşum Oranlarının Değerlendirilmesi..	56
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER..	59
KAYNAKLAR..	61
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Murashige & Skoog (1962) temel tuzlarını içeren besi ortamı.....	19
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan BA ve NAA kombinasyonları.....	23
Çizelge 4.1. Carrizo sitranjında kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri	28
Çizelge 4.2. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri	32
Çizelge 4.3. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri.....	35
Çizelge 4.4. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri	38
Çizelge 4.5. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri	41
Çizelge 4.6. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri	43
Çizelge 4.7. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri	44
Çizelge 4.8. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdeleri.....	48
Çizelge 4.9. Carrizo genotipinde direkt ve indirekt oluşan sürgünlerin sayısı, yüzde değerleri	50
Çizelge 4.10. Carrizo genotipinde sürgünden elde edilen bitkicikler	51
Çizelge 4.11. Genotiplerin kallus oluşturma oranları	55
Çizelge 4.12. Genotiplerin rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus oranları	56
Çizelge 4.13. Genotiplerin sürgün oluşturma oranları	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Dünya turunçgil üretimi: 123.755.749 ton (FAO, 2010).....	2
Şekil 1.2. Türkiye turunçgil üretiminin türlere göre dağılımı (ton) (Anonim, 2013a)3	
Şekil 3.1. Carrizo sitranjına ait görüntüler (Anonim, 2013b)	16
Şekil 3.2. Tuzcu Kleopatra mandarinine ait görüntüler (Anonim, 2013b)	17
Şekil 3.3. Tuzcu 31-31 turuncuna ait görüntüler (Anonim, 2013b).....	18
Şekil 3.4. Gou Tou turuncuna ait görüntüler (Anonim, 2013b).....	18
Şekil 3.5. MS besi ortamı hazırlığı aşamaları	20
Şekil 3.6. Tohumların sterilizasyonu	21
Şekil 3.7. Tohumların kültür ortamlarına aktarılması aşamaları.....	22
Şekil 3.8. Kök eksplantlarının besin ortamına aktarılması	24
Şekil 4.1. Carrizo sitranjında kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri	29
Şekil 4.2. Carrizo sitranjında kallusların mikroskopta görünümü (10x10 kez büyütülmüş).....	30
Şekil 4.3. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri	32
Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 genotipinde elde edilen kallusların mikroskopta görünümü (10x10 kez büyütülmüş)	33
Şekil 4.5. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri.....	35
Şekil 4.6. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininde kök eksplantlarından elde edilen kallusların mikroskop görüntüleri (10x10 kez büyütülmüş)36	
Şekil 4.7. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdelerinin grafiksel gösterimi.....	38
Şekil 4.8. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallusların mikroskop görüntüleri (10x10 kez büyütülmüş).....	39
Şekil 4.9. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri grafiksel gösterimi	41
Şekil 4.10. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdelerinin grafiksel gösterimi.....	43

Şekil 4.11. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi.....	45
Şekil 4.12. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdelерinin grafiksel gösterimi.....	48
Şekil 4.13. Carrizo sitranjında kök rejenerasyonundan gelişen bitkicikler.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

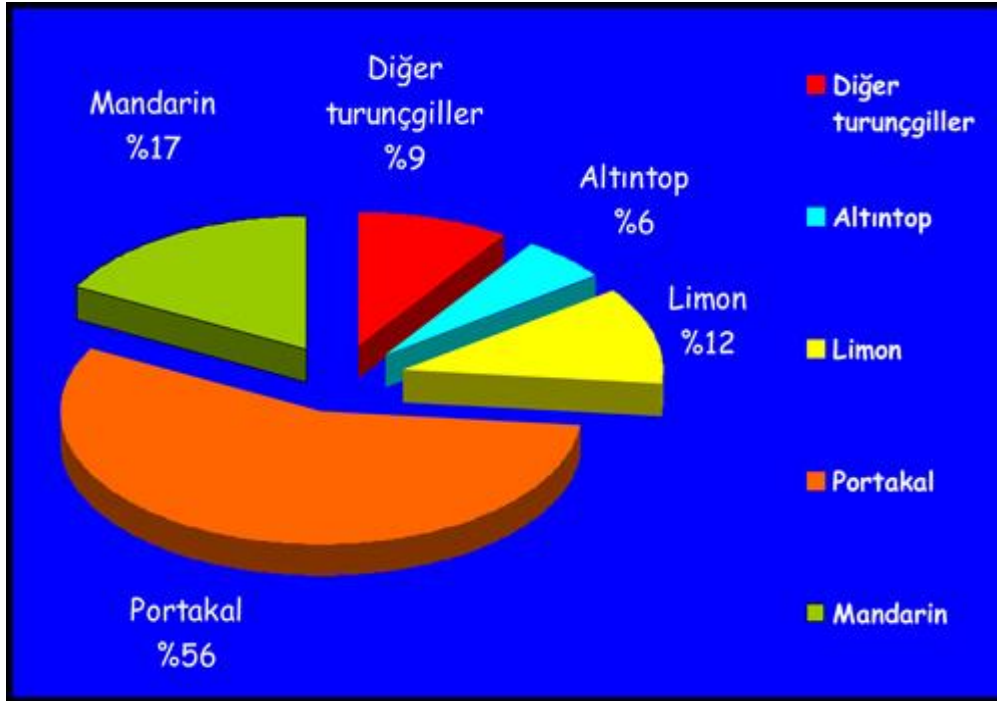
BAP	: Benzylamino purine
NAA	: Naphthalene acetic acid
BA	: Benzil adenin
μM	: Mikro molar
MS	: Murashige & Skoog (1962)
ME	: Malt ekstract
B5	: Gamborg' s B5 besin ortamı
KI	: Kinetin
GA ₃	: Gibberellic acid
MT	: Murashige & Tucker (1969)
M	: Molar
4-CPPU	: N-(2-chloro-4-pyridyl)- N' -phenylurea
2,4 D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
4-CPA	: 4- chlorop henoxyacetic acid
MCPA	: 2-methyl - 4 chloro phenoxy acetic acid
2,4,5- T	: 2,4,5-Trichloro phenoxy acetic acid
IBA	: Indole butyric acid
MB	: 1 mg/L benzylaminopurine (BAP) içeren MS-B5 basal ortam
ADS	: Adenine sulphate
IAA	: Indole acetic acid
SH	: Schenk ve Hildebrant (1972)
EtOH	: Etil Alkol
g	: Gram
L	: Litre
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
°C	: Santigrad derece
dk	: Dakika

1. GİRİŞ

Turunçgiller, dünyada ve Türkiye’ de yetiştiriciliği yapılan en önemli meyve gruplarından biridir. Yaygın olarak üretilen türleri portakal, mandarin, limon ve altıntoptur. Turunç ise turunçgil yetiştiriciliğinde anaç olarak kullanılmasından dolayı büyük bir öneme sahiptir. Turunçgillerin, taze olarak tüketilmelerinin yanında meyve suyu sanayinde de kullanılmaktadır. Eczacılık ve parfüm sanayinde de aromalarından faydalanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde modern işleme tesislerinin yaygın olması, bu ürünlerin nakliye ve depolama koşullarına uygunluğu tüketimini artırmaktadır (Anonim, 2008).

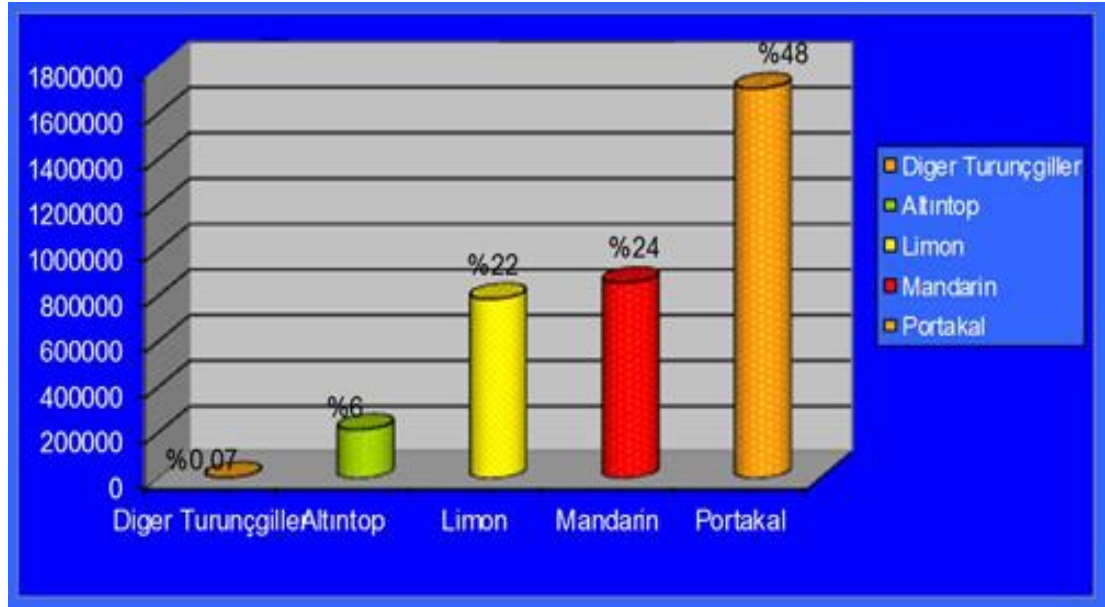
Dünyada turunçgil üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarıküre’ de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarıküre’ de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya’ da ekonomik olarak üretilmektedir (Karahocagil, 2003).

Dünya turunçgil üretimi, yaklaşık 120 milyon ton olup bunun % 56’ ını portakal, % 17’ sini mandarin, % 12’ sini limon ve % 6’ ını altıntop oluşturmaktadır. Değişen tüketici tercihleri nedeniyle, son on beş yılda, portakal üretimindeki artış % 2,2’ de iken, limon üretimi % 47, mandarin üretimi % 33 artmış, altıntop üretimi ise % 9 azalmıştır. Turunçgil üretimindeki toplam artış ise % 20’ nin üzerinde olmuştur (FAO, 2010). Dünya turunçgil üretimi Şekil 1.1 de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Dünya turunçgil üretimi:123.755.749 ton (FAO, 2010)

Türkiye’ de oldukça eski bir geçmişe sahip olan turunçgil yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren üretimde önemli artışlar olmuştur. Türkiye, turunçgil yetiştiriciliğinde ekolojik koşullar açısından son derece uygundur. Turunçgil alanları Ege Bölgesi’ nde en yüksek üretim sınırına ulaşmış, Akdeniz Bölgesi’ nde ise turunçgil yetiştirilen alanların turizme açılmasıyla üreticiler, tarla bitkileri yetiştiriciliği yaptıkları alanlarda turunçgil yetiştirmeye başlamışlardır (Akgün, 2006) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Türkiye turunçgil üretiminin türlere göre dağılımı (ton), (Anonim, 2013 a)

Turunçgillerin anavatanı esas olarak Güneydoğu Asya bölgesidir. Ancak I. ve II. derecede anavatanları olmak üzere 2 kısma ayrılmaktadır (Yeşiloğlu, 2007).

I. Derecede Anavatanı olarak kabul edilen yerler;

- Ø Çin’ in güney kıyıları ve Sarı Irmak Vadisi’ nin iç kısımları,
- Ø Tayland,
- Ø Vietnam,
- Ø Kamboçya ve Malezya
- Ø

II. Derecede Anavatanı olarak kabul edilen yerler;

- Ø Himalayalar’ın güney etekleri,
- Ø Hindistan

Dünyada ve Türkiye'de büyük öneme sahip turuncgiller genellikle tohum, çelik ve öteki vegetatif yöntemlerle kolaylıkla çoğaltılabilirse de, özellikle hastalıklardan korunma, iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilme, verim ve kaliteyi arttırma, bitki büyümesini kontrol edebilme gibi nedenlerden dolayı anaç kullanma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, turuncgillerde çekirdeksiz çeşitlerin tohumla çoğaltılmalarının olanaksızlığı, çeşit muhafazasında mutasyon eğilimleri, monoembriyonik çeşitlerin çok heterojen bir genetik yapıya sahip olmaları sonucu açılımların meydana gelmesi, anaç kullanımını gerektiren diğer etmenlerdir. Turuncgillerde ekonomik anlamda yetiştiricilik yapmak için anaç kullanımı zorunludur ve Akdeniz bölgesinde en yaygın olarak kullanılanı turunc anacıdır. Akdeniz Bölgesi turuncgiller yetiştiriciliği, abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin tehdidi altındadır. Tristeza virüsünün ve bunun vektörü olan *Toxoptera citricida* zararlısının yayılması halinde hastalığa duyarlı turunca alternatif olabilecek yeni anaçlara ihtiyaç duyulacaktır (Ollitrault ve ark., 2006, Şimşek, 2009). Bu sebeplerden dolayı turuncgillerde yeni anaç ıslahı zorunlu hale gelmiştir ve tüm dünyada bu konuda çalışmalar halen devam etmektedir.

Türkiye' de yer alan her bölgenin sahip olduğu farklı iklim, toprak ve yetiştiricilik koşulları o bölgede kullanılacak çeşit ve çeşidin anaç ile uyumu, kullanılacak anacı belirlemede en önemli kriterlerdir. Bu kriterler göz önünde bulundurulduğunda bölgeye uyum sağlayan bir anacın kalem ile iyi uyuşması ve anacın özellikle verim ve meyve özellikleri bakımından çeşit üzerine olumlu etki yapması gerekmektedir. Anacın çeşit ile uyuşmazlık göstermesi, anacın bölgeye uygun olmaması yeni anaç geliştirme arayışı içerisine girmemize neden olmaktadır (Biçen, 2008).

Dünyada kullanılan bazı turuncgil anaçları arasında, Amerika ve Arjantin' de üç yapraklı ve melezleri, Florida ve Brezilya' da *Citrus jamphiri* ve *Citrus limonia*, Güney Afrika' da ise Kleopatra mandarini ve melezleri yer almaktadır. Ülkemizde ise turuncgil meyveleri üretiminin büyük bir bölümünün sağlandığı Akdeniz Bölgesi' nde en yaygın anaç turuncdur. Kuzeydoğu Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde ise üç yapraklı, kullanılan tek anaç durumundadır. Geçit Ege bölgesi yani Büyük Menderes vadisinde ise turunc ve üç yapraklı karışık olarak

kullanılmaktadır. Son yıllarda Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde Carrizo sitranjının portakal, mandarin ve altıntop türlerine anaç olarak kullanımı hızlı bir artış göstermiştir (Tuzcu ve ark., 2001).

Turunçgillerin dünyada kaydettiği hızlı gelişmede, klasik yöntemlerde karşılaşılan sorunların çözümünde kullanılan *in vitro* bitki doku kültürü teknikleri ve moleküler çalışmalar büyük rol oynamaktadır. Turunçgil ıslah çalışmaları ve genetik kaynakların muhafazasında *in vitro* doku kültürü teknikleri hızlı bir şekilde gelişmektedir. Modern ıslah ve muhafaza yöntemleri içerisinde; organogenesis, sürgün ucu kültürü, embriyogenik kallus eldesi, somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon, gen aktarma çalışmaları yer almaktadır (Biçen, 2008).

Bitki ıslahında yoğun bir şekilde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden biri de organogenesisdir. Organogenesis, hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olarak sürgün veya kök taslağı olarak adlandırılan tek kutuplu, vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesini sağlayan uygulamalardır. Organogenesis hücre veya dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitkilerin üretimine kolaylıklar sağlamaktadır.

Direk ve indirek olmak üzere ikiye ayrılan organogenesiste; kallus oluşturmada sürgün oluşturma direk organogenesis olarak adlandırılır. Bu yolla elde edilen sürgünlerde varyasyon açılımları gerçekleşebilir. İndirek organogenesiste ise kallustan sürgün oluşur, gen çalışmalarına uygundur. Her iki durumda da elde edilen sürgünler bitki transformasyon çalışmalarında oldukça önemlidir.

Organogenesis içerisinde yer alan kökten bitki rejenerasyonu uygulaması, bitkinin köklerinden yeni bitkiler elde etmek olarak açıklanabilir. Fakat bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolü yoktur. Her bitki türü, hatta her bitki çeşidi için spesifik bir sistemin optimize edilmesi edilmesi gerekir. *In vitro* koşullarda kök eksplantlarından bitki rejenerasyonu, bitki ıslah süreci için olumlu sonuçlar doğurabilecek bir etmendir.

Bölgemizde artan turunçgil yetiştiriciliğinde kullanılan anaçların hastalıklara ve zararlılara dayanıklı bitkiler olmasının yanında; yüksek boyluluğu ve sıkı yapısı

gereği hasatı zorlaştıran anaçların yerine erken meyveye yatan, hasadı kolaylaştıran bodur anaçların eldesi yetiştiriciler için büyük bir avantaj sağlayacaktır.

Köklerden bitki rejenerasyonunun en önemli sebeplerinden biri ise *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinde doğal olarak yer alan plazmid içerisinde bulunan Rol genlerinin bitkilerde saçak kök oluşturmaları ve bu köklere geçen Rol genlerini taşıyan bitkilerin, bu köklerden elde edilmesidir. Kullanılan anaçların bodurluğunu sağlayarak; turuncgil yetiştiriciliğindeki budama, ilaçlama, erken meyveye yatma, meyve verimini artırma ve hasat için gereken işçilik ve maliyetin azaltılması, yetiştiriciler için oldukça kolaylık sağlayacaktır. *A. rhizogenes* Rol geni; bitkide boğum aralarının kısalması ve küçük yapılı ağaçlar oluşturmaya sağladığı için bu Rol genini taşıyan saçak kökler, bodur anaç ıslahı için önemlidir. Oluşturulacak uygun kök rejenerasyon protokolü ile Rol genlerini taşıyan saçak köklerden bitki rejenerasyonu sağlanabilecektir. Ayrıca bu Rol geni bitkide doğal olarak bulunacağı için anaç ıslahında genetiği değiştirilmemiş bodur anaçlar elde edilmiş olacaktır.

Bu tez çalışmasının amacı Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 turuncu, Tuzcu Kleopatra mandarini ve Gou Tou turuncunda kökten bitki rejenerasyon protokolünün optimize edilmesidir.

Turuncgillerde bodur anaç ıslahı projesi kapsamında projenin 1. aşaması kök rejenerasyonunun sağlanmasıdır. Yaptığımız bu tez çalışması ile kökten bitkiciklerin rutinde elde edilebilmesinin sağlanması, *A. rhizogenes* bakterisinin plazmidinde yer alan Rol genlerinin bitkilere aktarılması sonucunda oluşacak saçak köklerden turuncgil yetiştiriciliğinde kolaylık sağlayacak bodur anaçların sorunsuz bir şekilde elde edilmesinin önünü açacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tristeza (Göçüren) salgını ve Florida’ da meydana gelen don olayları sonrasında (1920) dünyada turunçgil anaçları üzerine ciddi çalışmalar yapılmaya başlanmış ve değişik özellikte anaçlar ortaya çıkarılmıştır. Hastalık kontrolü ve çevre şartlarına uyum yanında ağacı erken meyveye yatırmak, ağaç ömrünü uzatmak, verimi artırmak, sık dikim, meyve kalitesini yükseltmek gibi amaçlar için anaç kullanılmaktadır (Uzun, 2002).

İdeal bir turunçgil anacında aranacak özellikler:

- Ø Hastalık ve zararlılara dayanıklılık
- Ø Toprak özelliklerine adaptasyon
- Ø İklim koşullarına özellikle soğuklara dayanıklılık
- Ø Çok çekirdeklilik
- Ø Yüksek poliembriyoni oranı
- Ø Kalemle iyi uyuşma olmaktadır.

Ticari turunçgil anaçları genellikle spesifik bölgelerde hastalık, nematod, soğuk ve farklı toprak koşullarına dayanıklı, istenilen taç büyüklüğüne sahip, kalite ve verim gibi yetiştiricilikte arzu edilen tüm özellikleri taşımamaktadır. Bu nedenle, günümüzde istenilen tüm özelliklere sahip yeni turunçgil anaçlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Son yıllarda anaç arayışlarında ve diğer üretim çalışmalarında kullanılan *in vitro* teknikleri bu konuda yol gösterici sonuçlara ulaşmayı sağlamıştır. Bitki rejenerasyonu yöntemleri ile ilgili yapılan çalışmalar tarandığında farklı bitkilerle organogenesis ve kök rejenerasyonu çalışmaları olduğu görülmektedir. Fakat turunçgillerde kökten bitki rejenerasyonu ve optimizasyonu ile ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir.

Bu bölümde, turunçgillerde ve diğer bitkilerde *in vitro* koşullarda bitki rejenerasyonu ile ilgili yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

2.1. Turunçgillerde Yapılan Rejenerasyon Çalışmaları

Erner ve ark., (1975), portakalın (*C. sinensis*) doku kültüründe gelişimi için ortama o portakala ait meyve suyu eklenmesinin gerekliliğini araştırmışlardır. Meyve suyunun hücre büyümesi ve hücre bölünmesinde büyümeyi düzenleyici etkisinin olduğunu belirlemişlerdir.

Kochba ve ark., (1978), embriyogenesis ile ilgili yaptıkları çalışmada, Shamouti portakalının nüseller dokuları ve döllenmemiş ovüllerden elde ettikleri kallusları kullanmışlardır. Alt kütürler boyunca kallusların oksin ve sitokininlere bağlı olarak gelişimlerini devam ettirdiklerini bildirmişlerdir.

Nito ve ark., (1990), yapmış oldukları çalışmada, Satsuma mandarinin (*C. unshiu* Marc.) *in vitro* koşullarda, usare keseciklerinden kallus ve sürgün gelişimi sağlamıştır. Murashige & Skoog (1962) ortamına NAA, KI ve GA₃ eklenmesiyle elde edilen besi ortamında kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Kültüre alınan eksplantlardan 60 gün sonra kallus oluşumunu gözlemişler ve kallus oluşumu için en iyi ortamın MS ortamına 1 mg/L NAA ve 1 mg/L KI eklenmesiyle elde edilen besi ortamı olduğunu tespit etmişlerdir. Kalluslardan 7-10 gün sonra somatik embriyoların oluştuğu görülmüştür. Somatik embriyolardan bitki gelişimi 1 mg/L GA₃ içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Beloualy (1991), yapmış olduğu çalışmada, *C. aurantium*, *Poncirus trifoliata* ve Carrizo sitranjı (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) anaçlarının epikotil kültürlerinden elde edilen kalluslarla somatik embriyo ve organogenesis yoluyla bitki elde etmiştir. Epikotil ve kök kültürlerinin NAA ve BA içeren ortamda gelişimini gözlemiştir. En yüksek bitki gelişimi 1 mg/L NAA+5 mg/L BA içeren besi ortamında *P. trifoliata* ve Carrizo sitranjı anaçlarında ve 1 mg/L NAA+10 mg/L BA içeren ortamda *C. aurantium* anacında görülmüştür.

Gill ve ark., (1995), yapmış oldukları çalışmada, *C. reticulata* Blanca ‘ Local Sangtra’ çeşidinin *in vitro* koşullarda geliştirilen nüseller fidanlarının kök segmentleri, kotiledon, epikotil ve yaprak eksplantlarından kallus kültürleri oluşturmayı amaçlamışlardır. Kültürlerin 10. gününde kesim uçlarında kallus oluşumları başlamıştır. Epikotil segmentleri kallus oluşumunda en iyi eksplant olarak

belirlenmiştir. En iyi kallus oluşumu 10 mg/L NAA ve 0.5 mg/L KI büyüme düzenleyici içeren MS ortamından elde edilmiştir. En iyi somatik embriyogenesis oluşum ortamı MS ortamına 10 mg/L NAA, 1 mg/L KI ve MS vitaminleri eklenmesiyle bulunmuştur. Epikotillerden elde edilen kalluslar diğer eksplantlardan elde edilenlere göre %83 daha fazla bulunmuştur. Somatik embriyoların çoğu normal embriyo gibi çimlenmiş fakat bazıları yalnızca sürgün oluşturmuştur. Sürgünlerden kök oluşumu 7-10 gün sürmüş, her sürgün için elde edilen kök sayısı ve uzunluğu kullanılan besi ortamına göre değişmiştir.

Goh ve ark., (1995), *in vitro* koşullarda yetiştirilen şadok (*C. grandis* Osbeck) fidanlarının yaprak ve kotiledon eksplantlarından kallus kültürleri oluşturmuşlardır. Epikotil eksplantı ve kök segmentinde direk organogenesis ile bitki rejenerasyonları sağlanmıştır. Kotiledon eksplantlarında en iyi kallus oluşumu MS (1962) ortamına 26,9 µM NAA, 2,3 µM 2,4-D ve 4,4 µM BA eklenmesiyle bulunmuştur. Yaprak eksplantlarında en iyi kallus oluşumu 4,52 µM 2,4-D ve 4,4 µM BA içeren MS ortamında bulunmuştur. Tüm kallusların %50' sinde sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Carimi ve ark., (1998), yapmış oldukları çalışmada 3 farklı ortamda (MS+ME; MS+ME+4.6 M Kinetin; MS+ME+13.3 M BAP) Navel grubuna ait 11 farklı genotipi stigma, stil ve ovül eksplantlarından somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu oluşumunda kullanmışlardır. En yüksek somatik embriyo oluşumunu BAP içeren ortamda stigma, stil ve ovül eksplantlarından elde edildiğini belirtmişlerdir.

Carimi ve ark., (1999), turuncgillerde somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında altı farklı turuncgil çeşidinin pistillerini üç farklı ortamda (MS; MS+500 mg/L ME; MS+500 mg/L ME+13,3 µM BA) kültüre almışlardır. Yaptıkları çalışmada kullanılan genotipin, eksplantın ve besi ortamının bitki rejenerasyonu, somatik embriyo ve kallus oluşumu üzerinde farklı etkileri olduğunu belirtmişlerdir.

Chakravarty ve Goswami (1999), yapmış oldukları çalışmada, yabani bir portakal olan *C. acida* Roxb.' ninin *in vitro* koşullarında çoğaltılması ve uzun süreli muhafaza edilmesi amacıyla epikotil eksplantları kullanılarak etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Araştırmacılar *C. acida*' nın uzun süre (2 yıl) saklanan kalluslarından

başarılı bir şekilde sürgün ve daha sonra da bitkicik elde etmişlerdir. Bu yöntemle çok küçük bir kallus parçasından çok sayıda bitkicik elde edilebileceğini vurgulamışlardır. Kallus kültürlerindeki virüs konsantrasyonlarının ana bitkiden daha az olduğunu, alt kültür sayısının artması ile virüs konsantrasyonunun azaldığını, böylece virüslerden ari bitki elde edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada yapılan sitolojik analizler ile bitkiciklerin fenotipik olarak aynı olduğu ve kromozom sayılarında herhangi bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir.

Bordon ve ark., (2000), Dört tür ve bir hibrit turuncgilin epikotil eksplantını kullanarak eksplantın ortama yerleştirilme durumu, hormonlar ve ışığın etkisini araştırmışlardır. Tüm denemelerde eksplant dikey olarak yerleştirildiğinde kallus oluşturmaksızın direk organogenesis yolu ile sürgünler elde edilmiş, fakat Troyer sitranjı' m epikotillerini yatay olarak kültüre aldıklarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Direk organogenesis yolu ile sürgün oluşumu karanlık ortamda engellenmiş, fakat bu engelleyici faktör sitokinin (BAP) kullanımıyla Troyer sitranjında tam olarak, diğerlerinde kısmi olarak ortadan kalkmıştır. Troyer sitranjında organogenik kallus oluşumu sitokinin/oksin dengesi kurulduğunda meydana gelmiştir. *C. macrophylla* genotipinin karanlık denemesinde kallus oluşurken aydınlıkta oluşmamıştır. Elde edilen sürgünler NAA ile birlikte düşük dozlarda BAP kullanılarak köklendirilmişlerdir. Bu çalışma her genotip için uygun rejenerasyon koşullarının optimizasyonunun gerekliliğini ortaya koymuştur.

Fiore ve ark., (2002), limon ve portakal türlerinde stigma ve stillerinden kallus oluşumu, somatik embriyo ve bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 2,4-D ve 4-CPPU' nun bulunduğu 16 farklı ortam kullanılmıştır. Somatik embriyo oluşumu 3-5 ay sonra gözlenmiştir. Stillerden en yüksek somatik embriyo oluşum oranı (% 16) 4M 4-CPPU ortamından elde edilirken, stigmalarından (%24.8) 4M 4-CPPU ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca limonun embriyogenik potansiyelinin portakaldan daha iyi olduğunu ve somatik embriyolardan yaklaşık 3 ay sonunda bitki rejenerasyonu meydana (limon; % 75, portakal; % 53) geldiğini bildirmişlerdir.

Tao ve ark., (2002), *C. grandis* (L.) Osbeck (pummelo) genotipinin yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve sürgün gelişimini araştırmışlardır. Pummelo tohumlarından elde edilen bitkinin yapraklarından kallus oluşumu sağlamak için yedi

farklı (BA, 4-CPA, 2,4-D, Dicamba, MCPA, NAA, Picloram, 2,4,5-T) oksin içeren besi ortamı kullanmışlardır. 2,4-D içeren besi ortamı kallus oluşumu için en uygun ortam olarak belirlenmiştir. 0.9 ve 0.4 μM 2,4-D içeren besi ortamları, yeşil renkli, sıkı yapılı kalluslar meydana getirmişlerdir. Her bir kallus başına 13 sürgün olduğu bulunmuştur. Sürgünlerden köklü bitkiler elde etmek için 9.84 μM IBA ve 5.37 μM NAA içeren besi ortamı kullanılmıştır.

Begum ve ark., (2004), turuncgillerde kullanılabilecek *in vitro* kültür tekniklerini araştırmışlardır. Kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunun sürgün ucu kültürü ve gelişmemiş ovüllerden elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Avenido ve ark., (2005), mandarinlerde *in vitro* rejenerasyon çalışmaları yürütmüşlerdir. Çalışmada tohumları MB ortamında (MS-B5+1 mg/L BAP) kültüre almışlar ve 7 gün sonunda çimlenme gözlenmiştir. Kotiledon ve sürgün uçları yeni MB ortamında kültüre alınmış ve 3 hafta sonunda kesim yerlerinden ortalama 3-5 sürgün meydana gelmiştir. Epikotiller MB ortamında kültüre alınmış ve kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Daha sonra elde edilen kalluslardan MG ortamında sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. Sürgünler MG (MS+30g sakkaroz+2mg/L GA_3) ortamında 30-40 sürgün meydana getirmişlerdir.

Mukhtar ve ark., (2005), *C. reticulata*' da sürgün ucu ve nod (bğüm) eksplantlarını kullanarak, büyüme maddeleri ve organik katkı maddelerinin rejenerasyona etkisini araştırmak amacıyla, MS içeren ortamda BAP ve kinetin farklı konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, 1 mg/L BAP ve 1.5 mg/L kinetin içeren ortamda en yüksek sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Biçen (2008), yapmış olduğu çalışmada, on turuncgil genotipinde stil ve ovül kültürü kullanarak kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu sağlamıştır. MS makro ve mikro elementleri ve Murashige ve Tucker (MT) vitaminlerine ek olarak 500 mg/L malt ekstrakt ile 1 mg/L 2,4-D, 3 farklı BA konsantrasyonu (0, 0.5, 1mg/L) birinci yıl denemelerinde besi ortamı olarak kullanılmıştır. İkinci yıl stil eksplantları, MS basal ortamı, ME ile beraber 3 farklı BA konsantrasyonu (1, 2 ve 3mg/L) içeren ortamda kültüre alınmıştır. İkinci yıl denemelerinde MS makro ve mikro elementleri, MT vitaminleri ile ME herhangi bir büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alınmış, ayrıca 1 mg/L 2,4-D ve 3

farklı BA (0, 0.5, 1 mg/L) konsantrasyonunu içeren ortamlar ovül eksplantları için kullanılmıştır. Stil ve ovül kültürlerinden somatik embriyo oluşumuna genotipler farklı tepkiler vermiştir. Stil eksplantlarından somatik embriyo oluşumu %0 (AREC Swingle Sitrumelo, M2 Sitranjı, Volkamariana, Pomeroy üç yapraklısı) ve %100 (Gou Tou turuncu) arasında değişirken aynı şekilde ovül eksplantlarında somatik embriyo oluşum oranları %0 (Carrizo sitranjı, Alanya Dilimli portakalı, AREC Swingle Sitrumelo) ile %100 (Tuzcu 891 ve Kleopatra mandarini) arasında değişmiştir.

Aka Kaçar ve ark., (2011), Carrizo sitranjı ve Kleopatra mandarininde kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarını kullanarak, MS ortamında 1 mg/L BAP) hormonunun farklı konsantrasyonları (0.0, 2.5, 5.0 mg/L) ile 0.5 mg/L NAA kullanarak organogenesis çalışması yapmışlardır. Sonuçta, en iyi rejenerasyon Carrizo sitranjının kök eksplantlarından ve 2.5 mg/L BAP ile 0.5 mg/L NAA içeren ortamda elde edilmiştir.

2.2. Diğer Bitkilerde Yapılan Rejenerasyon Çalışmaları

Chen ve ark., (1987), İki papaya çeşidinde (*Carica papaya* cv. ‘ Solo’ and cv. ‘ sunrise’) sürgün ucu, gövde, yaprak, kotiledon ve kök eksplantlarının rejenerasyon potansiyelini araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuca göre; iki papaya çeşidinde kök ve sürgün ucundan kallus oluşumu; yaprak ,kotiledon ve kök eksplantlarına göre daha kolay olmaktadır. Somatik embriyogenesis, 3 aylık kök kültürlerinden elde edilmiştir. Embriyogenesisin en iyi gerçekleştiği ortamın içeriğinde MS ortamındaki inorganik tuzların yarısı, 160 mg/L ADS, 1 mg/L NAA, 0,5 mg/L KI, 1 mg/L GA₃ bulunmaktadır. Kallusta yüksek rejenerasyon kapasitesine, bu ortamda iki yıl sonra ulaşılmıştır. Somatik embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkiler sera koşullarında yetiştirilmiştir.

Agrawal ve ark., (1989), biberde (*Capsicum annuum* . cv.mathania) yapmış oldukları çalışmada; bu genotipe ait yaprak, kök, hipokotil, kotiledon, gövde sürgünleri ve embriyo eksplantlarını farklı büyümeyi düzenleyiciler içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 5.0 mg/L BAP içeren besi ortamının, sürgün gelişimi

için en iyi olduğu bulunmuştur. BAP miktarı tekrar 5.0 mg/L arttırıldığında sürgün gelişiminin devam etmediği görülmüştür. Tam bir bitki elde etmek için sürgünler 0.1 mg/L IBA veya NAA içeren ortamlara alınmıştır. Yapılan gözlemlerde direk farklılaşmanın kotiledonlardan gelişen sürgünlerde olduğunu göstermiştir. Rejenere olan bitkilerin normal diploid bitkiler olduğu görülmüş, organize olamayan kallus gelişen sürgünlerde farklılaşma ortaya koyamamıştır.

Srivastava ve ark., (1989), yaptıkları çalışmada; karpuz' da *Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski) hipokotil ve kotiledon eksplantlarından *in vitro'* dabitki rejenerasyonu sağlamıştır. Eksplantlar oksin; sitokinin ve oksin-sitokinin kombinasyonlarını içeren MS basal ortamında kültüre alınmış; bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Sağlıklı, yeşil, nodüler ve kompakt yapıdaki kalluslar NAA ve BA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Sırasıyla BA ya da NAA içeren farklı besi ortamlardaki kallus oluşumundan sonra sürgün ve kök farklılaşması oluşmuştur. Sürgün farklılaşması için BA gerekmektedir. Sürgün tomurcuğu ya da sürgün oluşumu için KI' nin etkisiz olduğu görülmüştür. Kök farklılaşması NAA ya da IAA içeren besin ortamlarda meydana gelmiştir. NAA içeren ortamlarda yüksek bir kök gelişimi olmuştur. NAA içeren besin ortamına rejenere olan sürgünler transfer edildiğinde gelişim göstermiş ve tüm bitkicikler gelişimlerinin devamı için toprağa transfer edilmiştir.

Bhat ve ark., (1995), yapmış oldukları çalışmada, üç karabiber türünün (*Piper. longum*, *P. betle* ve *P. nigrum*) kök, yaprak, gövde ve boğum eksplantlarını kullanarak uygun bitki rejenerasyon protokolü geliştirmeyi amaçlamışlardır. *P. longum* türünde en fazla sürgün sayısı kök eksplantlarından, daha sonra sırasıyla gövde, boğum ve yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. *P. betle* türünde sadece boğum, *P. nigrum* türünde ise sadece gövde segmentlerinden sürgün gelişimi gözlenmiştir. *P. longum* türünde yapılan analizler, sürgün tomurcuklarının köklerin kortikal hücrelerinden geliştiğini ve boğumlardan gelişen sürgünlerin kallus oluşturmada direk geliştiğini göstermiştir. BA' m sürgün gelişimi için KI' den üstün olduğu ve optimum konsantrasyonunun *P. longum* için 1-2 µM; *P. betle* ve *P. nigrum* için 10 µM olduğu tespit edilmiştir. Sürgün uzaması ve köklenmesi en iyi sırasıyla 0.5 µM BA ve 1 µM IAA içeren B5 ortamında gerçekleştirilmiştir.

Komai ve ark., (1996), Ispanak (*Spinacia oleracea L.*) bitkisinde *in vitro* da kökten bitki rejenerasyonu ve somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır.

Bu çalışmada ıspanak eksplantlarında etkili bir bitki rejenerasyonu sistemi kurmak ve somatik embriyogenesis için optimum kültür koşulları araştırılmıştır. Kotiledon, hipokotil, kök ve yaprak eksplantları, 10 g/L sakkaroz, 10 μ M NAA ve 0.1 μ M GA₃ içeren MS (1/2) kültür ortamına alınmıştır ve somatik embriyolar daha çok kök eksplantlarından elde edilmiştir. Embriyogenesis 6 farklı kültür ortamı kullanılarak oluşturulmuştur. Nitsch' s ve (1/2) MS ortamları; MS, White' s, B5 ve SH ortamlarına göre daha yüksek embriyo geliştirme oranı göstermiştir. Kök eksplantlarından elde edilen bitki rejenerasyon sistemlerinin; dişi ıspanak bitkilerinin vejetatif gelişimi için oldukça kullanışlı olduğu görülmüştür.

Haque ve ark., (1997), yaptıkları çalışmada, sarımsakta (*Allium sativum*) köklerden direk kök rejenerasyonu için yeni ve etkili bir metot geliştirmişlerdir. Köklerin gelişmesine ve uzamasına ortamın, büyüme düzenleyicilerinin ve kök eksplantlarının yaşının etkisi araştırılmıştır. En iyi büyüme düzenleyicileri kombinasyonunun 1 μ L NAA ve 10 μ L BA olduğu belirlenmiştir. Kök eksplantlarının %75' inde gelişimin başladığı görülmüştür. Kök gelişiminin başlaması farklı ortamlarda da benzer oranda gerçekleşmiştir. Kök eksplantlarında bitkicik oluşumu eksplantların sürmesinden 15-18 gün sonra gerçekleşmiştir. MS ortamının aksine her eksplantta 10' dan daha fazla sayıda sürgün gelişimi görülmüştür. B5 ortamında daha fazla sürgün oluşmasına rağmen sürgünlerin daha küçük olduğu gözlenmiştir. Sürgünlerin köklenmesi büyüme düzenleyicilerinin olmadığı bir ortamda gerçekleşmiştir. Bitkicikler, iklimlendirmenin yapılmadığı büyüme ortamından arazi ortamına başarılı bir şekilde transfer edilmiş ve bu bitkiler arasında fenotipik varyasyon gözlenmemiştir. Bu teknikle sarımsağın hızlı bir şekilde çoğaltılabileceği belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Tez çalışmasında, bitkisel materyal olarak turunçgil anaçlarından Tuzcu 31-31 turuncu, Gou Tou turuncu, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini ve Carrizo sitranjı kullanılmıştır. Denemeler Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.1. Bitkisel Materyal

Carrizo Sitranjı (*Poncirus trifoliata* Raf. X *Citrus sinensis* Osb. var “ Carrizo”): Swingle tarafından 1897 yılında Carrizo sitranjı, Washington Navel portakalı x Üç yapraklı melezlemesi ile elde edilmiştir (Şekil 3.1). Portakal ve altıntoplar için yaygın bir anaç olarak kullanılmaktadır. Carrizo sitranjı meyveleri çekirdekli ve yüksek oranda nüseller embriyoni göstermektedir ve anaç olarak kolaylıkla çoğaltabilmektedir. Dünyada Akdeniz havzası, ABD ve diğer bazı ülkeler ile Türkiye’ de Ege Bölgesi’ nde anaç olarak kullanılmaktadır (Biçen 2008; Aka Kaçar ve ark., 2011). Tohumla çoğaltımı ve aşılınması kolaydır. Üzerine aşılı ağaçlar kumlu, kumlu-tınlı topraklarda iyi gelişmektedir. Kireçli topraklarda zayıf gelişmektedir. Ancak, kireçli topraklara adaptasyon bakımından üçyapraklı anacından daha avantajlı görünmektedir (Davies ve Albrigo, 1994).

Kaliforniya’ da ve Akdeniz ülkelerinde anaç olarak başarı ile kullanılmaktadır. Troyer sitranjına göre daha hızlı gelişmekte ve meyve kalitesine daha olumlu etki yapmaktadır. Verimliliği yüksek, meyveye yatması erkendir. Kök nematoduna (*Radopholus similis* Cob.) toleranttır. Uçkurutan hastalığına ve Troyer sitranjına göre kuraklığa daha dayanıklıdır (Gardner ve Horanic, 1961a; Gardner ve Horanic 1961b; Ford 1966; Blondel 1967; Tuzcu, 1978; Özcan ve Ulubelde, 1984; Castle, 1984; Jackson, 1985). Cüceleşme (*Citrus exocortis* viroid) hastalığına çok duyarlıdır. Ancak, Göçüren (*Citrus Tristeza virus*) virüs ve Xyloporosis (Gözenekleşme) viroid hastalığına dayanıklıdır. *Phytophthora citrophthora*'ya orta

derecede duyarlıdır. Tristeza ve *P. citrophthora*'ya toleransları nedeniyle anaç olarak kullanımları yaygındır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).

İspanya' da portakal, mandarin ve mandarin melezlerinin % 80' i Carrizo sitranjı üzerine aşılanmaktadır. Güney Afrika' da da en çok kullanılan anaçlar arasında bulunmaktadır (Saunt, 2000).



Şekil 3.1. Carrizo sitranjı' na ait görüntüler (Anonim, 2013 b)

Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarin (Citrus reshni Hort. Ex. Tan.): Önemli bir özelliği, daha çok subtropiklerde etkili olan *P. citrophthora*' ya dayanaklılığı olan Kleopatra mandarin, dünyada yaygın kullanılan bir anaç değildir (Şekil 3.2). Ancak anaç olarak kullanımını arttıracak önemli özellikleri gözlemlenmiştir (Davies ve Albrigo, 1994). Florida' da hala yaygın olarak kullanılan anaçlardan biridir. Kleopatra üzerine aşıli altıntop çeşitlerinin meyve kalitesi mükemmel olmakta ancak, ağaçlarda düşük verimlilik ve küçük meyve oluşumuna neden olmaktadır. Kleopatra mandarin değişik toprak koşullarına kolayca uyum sağlayabilmektedir. Hafif tuzlu topraklardan ağır killi topraklara kadar geniş bir uyum yeteneğine sahiptir. Kumlu-ağır killi topraklarda iyi gelişmektedir. Yüksek tuzluluk ve pH' ya dayaklıdır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).

Kleopatra mandarininin en önemli avantajı, temel bazı turunçgil virüs ve viroid hastalıklarına karşı diğer anaçlardan daha tolerant olmalarıdır. Tristeza (Göçüren - CTV), Exocortis (Cüceleşme - CEVd) ile Xyloporosis (Gözenekleşme)

virüs ve viroid hastalıklarına karşı toleranttır. Nematodlara duyarlı, *Phytophthora citrophthora*'ya orta derecede duyarlıdır. Soğuklara dayanıklıdır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000). Bunun yanında tuzluluğa da dayanıklıdır. Kuru ve kireçli topraklara orta derecede dayanıklıdır. Üzerine aşılı ağaçlar geç meyveye yatar ve uzun ömürlü olurlar. Uçkurutan (*Phoma tracheiphila*), Tristeza (Göçüren), Exocortis (Cüceleşme) hastalıklarına toleranttır. Psorosis (Kavlama) hastalığına duyarlıdır. Genel olarak limonlarla iyi uyuşmaz. Florida’ da portakal ve mandarinlerde iyi sonuç verdiği saptanmıştır. Dünyada Arjantin ve Avustralya’ da kullanılmaktadır. Son yıllarda İspanya’da da bu anaca yönelme vardır (Davies ve Albrigo, 1994; Saunt, 2000).



Şekil 3.2. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarinine ait görüntüler (Anonim, 2013 b)

Tuzcu 31-31 Turuncu (*Citrus aurantium* L.): Prof. Dr. Önder Tuzcu tarafından 1974 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi’ nden selekte edilmiştir (Yeşiloğlu, 1982). Birçok biyotik (uçkurutan hastalığı, kök boğazı ve gövde zamklanması hastalığı) ve abiyotik stres faktörlerine (kireç, tuzluluk ve düşük sıcaklık) toleranttır (Şekil 3.3). Turunçgillerde yaygın olarak kullanılan bir anaçtır ve bölgemiz için oldukça uygundur. Dezavantajı Tristeza virüsüne duyarlı olmasıdır. Küçük yapılı, dik habitüs formu, soğuğa dayanıklı bir turunçtur (Demirkeser, 1993).



Şekil 3.3. Tuzcu 31-31 turuncuna ait görüntüler (Anonim, 2013 b)

Gou Tou Turuncu (*Citrus aurantium* L.): Çin kökenli bir anaç olup Tristeza hastalığına tolerant olması dışında toprak isteği veya diğer hastalıklara dayanımı konusunda bir bilgi yoktur (Şekil 3.4). Florida’ da Gou Tou anaçüzerine aşılı bitkiler diğer turunc anaçlarına aşılı bitkilere göre daha büyük bir habitusa sahip olmuşlardır (Saunt, 2000). Tristeza virüsüne tolerant olması nedeniyle turuncgil ıslahında çok değerli bir anaç durumundadır.



Şekil 3.4. Gou Tou turuncuna ait görüntüler (Anonim, 2013 b)

3.1.2. Besin Ortamı

Tez kapsamında kullanılan turuncgil tohumlarının çimlendirilmesinde ve çimlenen tohumların köklerinden bitki rejenerasyonu denemelerinde MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. MS besin ortamının içeriği Çizelge

3.1’ de sunulmuştur. MS bazal ortamına 30 g/L sakkaroz ve 8 g/L agar eklenmiştir. Ortamların pH’ ı 5.7’ ye ayarlanmıştır (Şekil 3.5).

Çizelge 3.1. Murashige & Skoog (1962) temel tuzlarını içeren besi ortamı

Bileşik	Konsantrasyon(mg/L)
Makro Elementler	(MS, 1962)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	(MS, 1962)
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .H ₂ O	15,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KI	0,83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Vitaminler	(MS, 1962)
Myo-inositol	100
Nikotinikasit	0.5
Piridoksin HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Amino Asit	(MS, 1962)
Glisin	2



Şekil 3.5. MS besi ortamı hazırlığı aşamaları

3.2. Metod

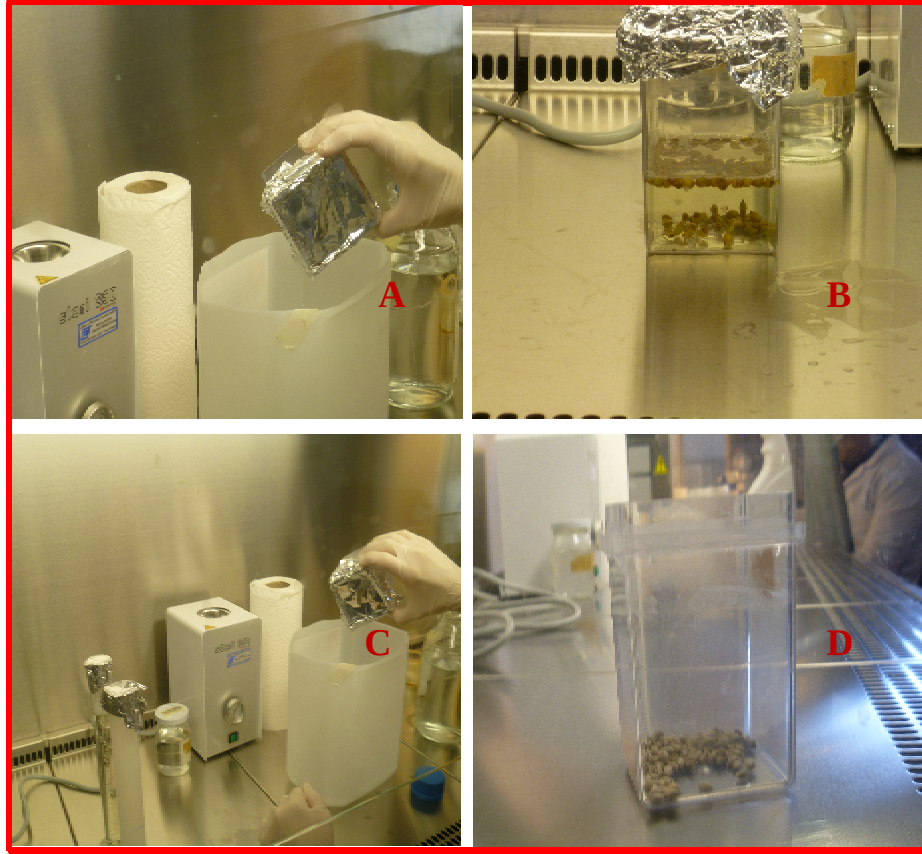
3.2.1. Tohum Örneklerinin Alınması

Tez kapsamında bitkisel materyal olarak kullanılan turuncgil anaçlarına ait tohumlar Ç.Ü. Bahçe Bitkileri Bölümü Turuncgil Fidanlığı'ndan, olgunlaşmış meyvelerden sağlanmıştır. Alınan meyveler laboratuvara getirilmiş ve tohumları çıkarılarak kültür öncesi sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Tohumların Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonunda tohumlar %70' lik etil alkol' de 2 , bekletilerek 3 defa steril saf su ile yıkanmış, ardından 15 dakika %20' lik sodyum ipoklorit

çözeltisinde (2-3 damla Tween-20 içeren) bekletilerek 3 defa steril saf suda yıkanmıştır. Tohumların sterilizasyon işlemi Şekil 3.6’ da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Tohumların sterilizasyonu

3.2.3. Tohumların Kültür Ortamına Aktarılması

Yüzey sterilizasyon sonrası turuncgil genotiplerinin tohumları MS bazal ortamı içeren tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.7). Tohumlar 6 hafta süresince büyütme odası koşullarında (16 saat aydınlık 8 saat karanlık, $\pm 25^{\circ}\text{C}$) kültüre alınmıştır.



Şekil 3.7. Tohumların kültür ortamlarına aktarılması aşamaları

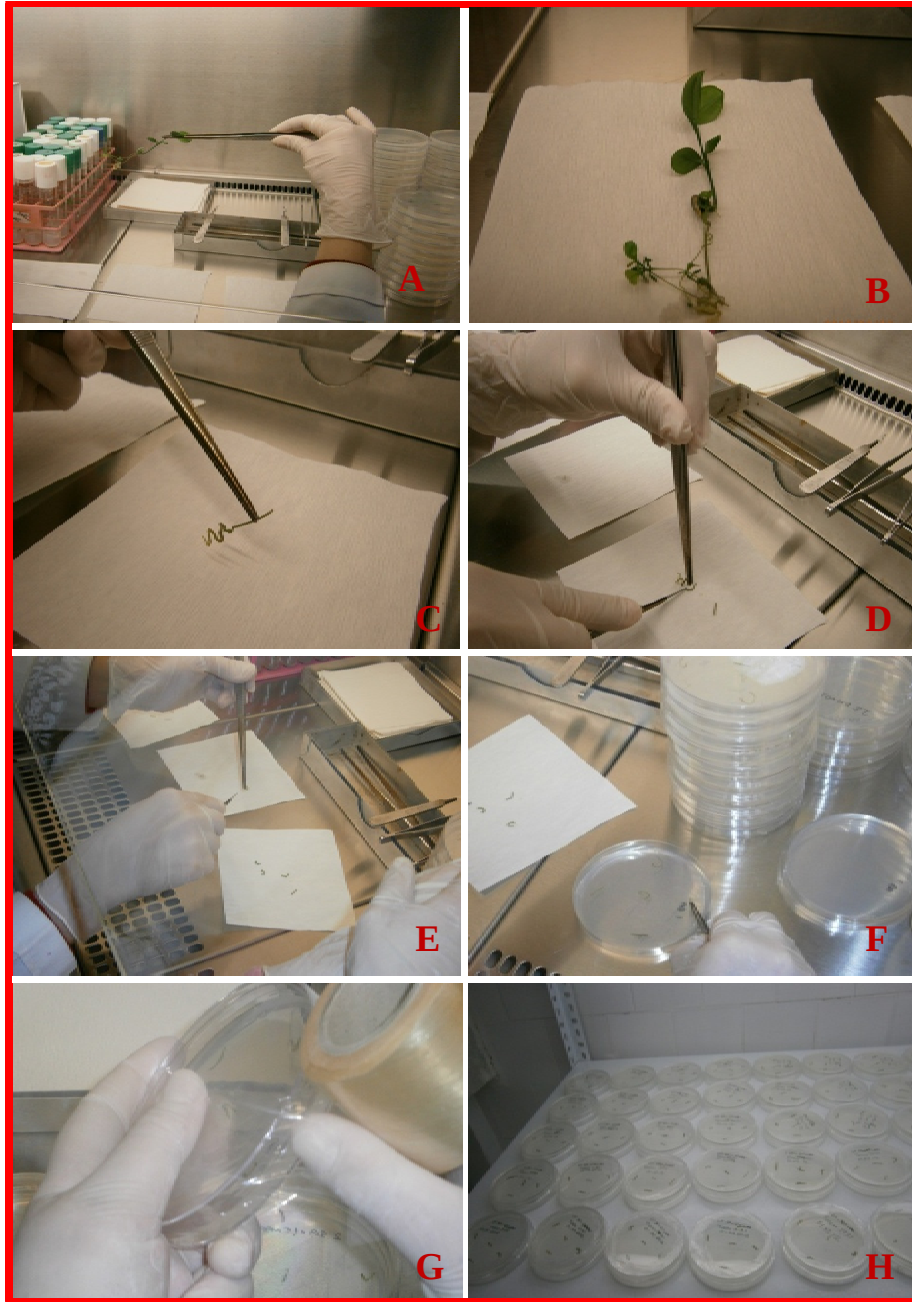
3.2.4. Kök Eksplantlarından Bitki Rejenerasyonu Denemesinin Kurulması

Tez kapsamında kullanılan ve *in vitro* koşullarda çimlenmeleri sağlanan Gou Tou turuncu, Tuzcu 31-31 turuncu, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini ve Carrizo sitranjı genotiplerine ait kök eksplantlarından bitki rejenerasyonun optimizasyonunu sağlamak amacıyla deneme kurulmuştur. Bu amaçla BA ve NAA ' m 21 farklı kombinasyonlarını içeren MS besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Kökler yaklaşık 10 mm kesilerek farklı konsantrasyonlarda BA ve NAA içeren MS ortamına aktarılmış ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25°C koşullarında kültüre alınmıştır (Şekil 3.8).

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan BA ve NAA kombinasyonları

	BA (mg/L)	NAA (mg/L)
Kontrol	0	0
BA	0.5	0
	0.5	0.5
	0.5	1.0
	0.5	1.5
BA	1.0	0
	1.0	0.5
	1.0	1.0
	1.0	1.5
BA	1.5	0
	1.5	0.5
	1.5	1.0
	1.5	1.5
BA	2.0	0
	2.0	0.5
	2.0	1.0
	2.0	1.5
BA	2.5	0
	2.5	0.5
	2.5	1.0
	2.5	1.5

Tezde kullanılan turunçgil genotiplerine ait kök eksplantları 12 hafta süresince kültüre alınmıştır. Eksplantlar her 4 haftada bir BA ve NAA' m 21 farklı kombinasyonunu içeren MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Çalışma boyunca 15 günlük sürelerle bitkilerdeki kallus, sürgün ve rejenerasyon oluşumu gözlenmiş ve kaydedilmiştir.



Şekil 3.8. Kök eksplantlarının besin ortamına aktarılması A: Köklenmiş bitkiciğin tüpten alınması B: Bitkiciğin kurutma kağıdına yerleştirilmesi C: Köklerin bitkicikten ayrılması D: Köklerin yaklaşık 10 mm kesilmesi E: Kesilen köklerin steril kurutma kağıdına ayrılması F: Köklerin petrilere yerleştirilmesi G: Hazırlanan petrilerin sarılması H: Petrilerin iklim odasında kültüre alınması.

3.2.5. Kök Eksplantlarından Oluşan Sürgünlerden Bitkiciklerin Elde Edilmesi

Tez kapsamında kullanılan turunçgil genotiplerinin kök eksplantlarından elde edilen sürgünler bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamı bulunan tüplere aktarılmıştır. Bitkicikler 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültür sonunda bitkicikler bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamı bulunan macentalara aktarılmış ve her konsantrasyondan elde edilen bitki sayısı belirlenmiştir.

3.2.5. İstatistik Analizler

Kök eksplantlarından bitki rejenerasyonunun optimizasyonunu sağlamak amacıyla kurulan deneme; 4 tekerrürlü, her tekerrürde 5 eksplant olacak şekilde, tesadüf parselleri deneme planına göre kurulmuştur. Deneme sonucunda kültüre alınan kök eksplantlarından elde edilen sürgün, kallus ve rejenerasyon oluşum oranları tespit edilmiş ve elde edilen veriler istatistik analizlere tabi tutulmuştur. Elde edilen yüzde değerlerine açılı transformasyonu uygulanmış ve ardından her genotip kendi içinde varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar ise LSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. İstatistik analizler JMP paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 turuncu, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini ve Gou Tou turuncu anaçlarında kökten bitki rejenerasyon protokolü optimize edilmiştir.

4.1. Genotiplerde Kallus Oluşumu

Tez kapsamında kullanılan turunçgil genotiplerinin kök eksplantlarından kallus oluşum oranları belirlenmiştir.

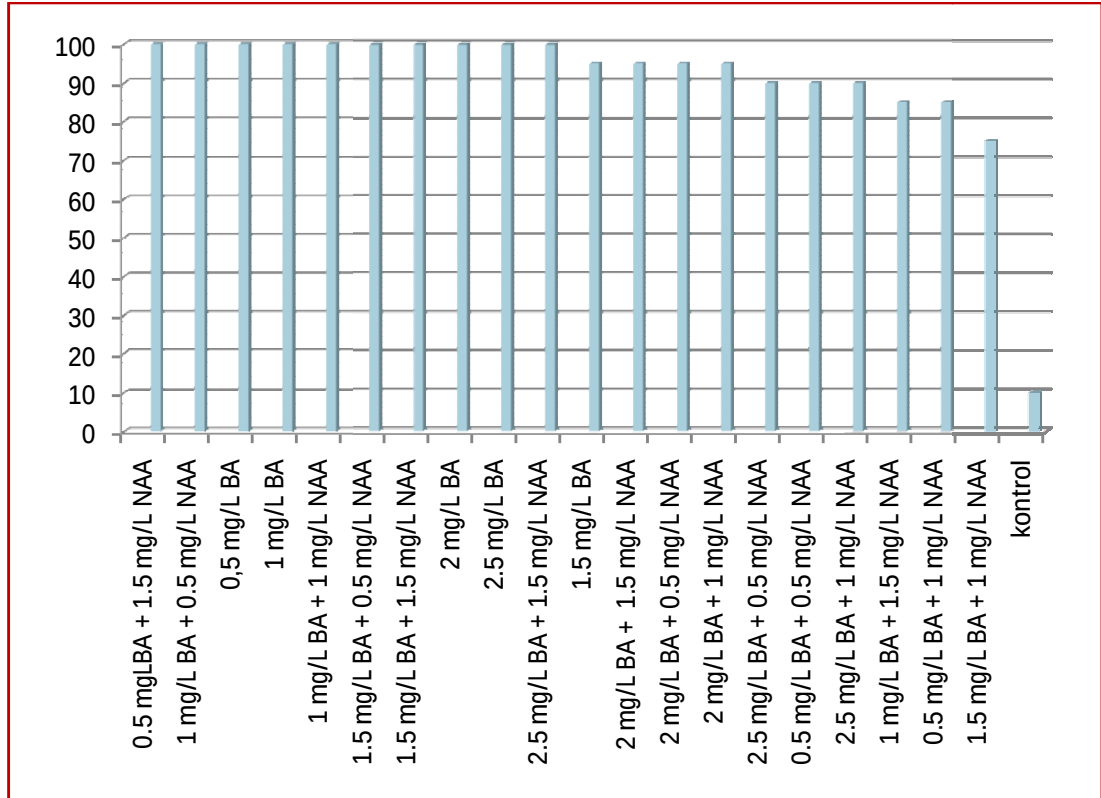
4.1.1. Carrizo Sitranjı Genotipinde Kallus Oluşumu

In vitro koşullarda çimlendirilen Carrizo sitranjı tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri Çizelge 4.1’ de sunulmuştur.

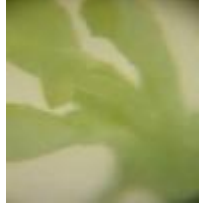
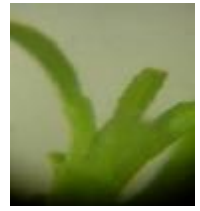
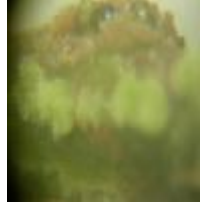
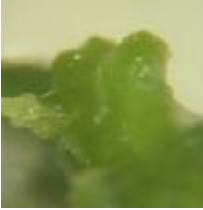
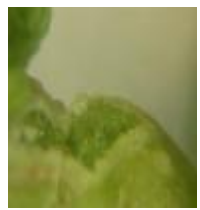
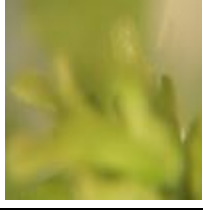
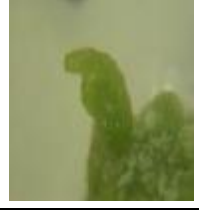
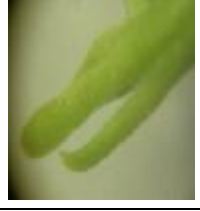
Çizelge 4.1.Carrizo sitranjında kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme edilmiş veriler	Yüzde Değerler
0.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
0,5 mg/L BA	90.00	100
1 mg/L BA	90.00	100
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
2 mg/L BA	90.00	100
2.5 mg/L BA	90.00	100
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA	83.36	95
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	83.36	95
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	83.36	95
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	83.36	95
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	80.19	90
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	76.72	90
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	76.72	90
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	73.55	85
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	70.08	85
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	67.50	75
Kontrol	13.28	10

Carrizo sitranjı genotipinde tüm konsantrasyonlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kallus oluşumu en iyi sırasıyla 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA; 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; 1 mg/L BA+1 mg/L NAA; 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; 1.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA; 0,5 mg/L BA; 1 mg/L BA, 2 mg/L BA; 2.5 mg/L BA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir ($P<0.05$). En düşük kallus oluşum oranı bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamından elde edilmiştir. Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi Şekil 4.1' de, bitki rejenerasyonuna ait görüntüler ise Şekil 4.2' de, sunulmuştur.



Şekil 4.1. Carrizo sitranjında kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

BA \ NAA				
	0	0,5	1	1,5
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				
Kontrol				

Şekil 4.2. Carrizo sitranjında kallusların mikroskopta görünümü (10x10 kez büyütülmüş)

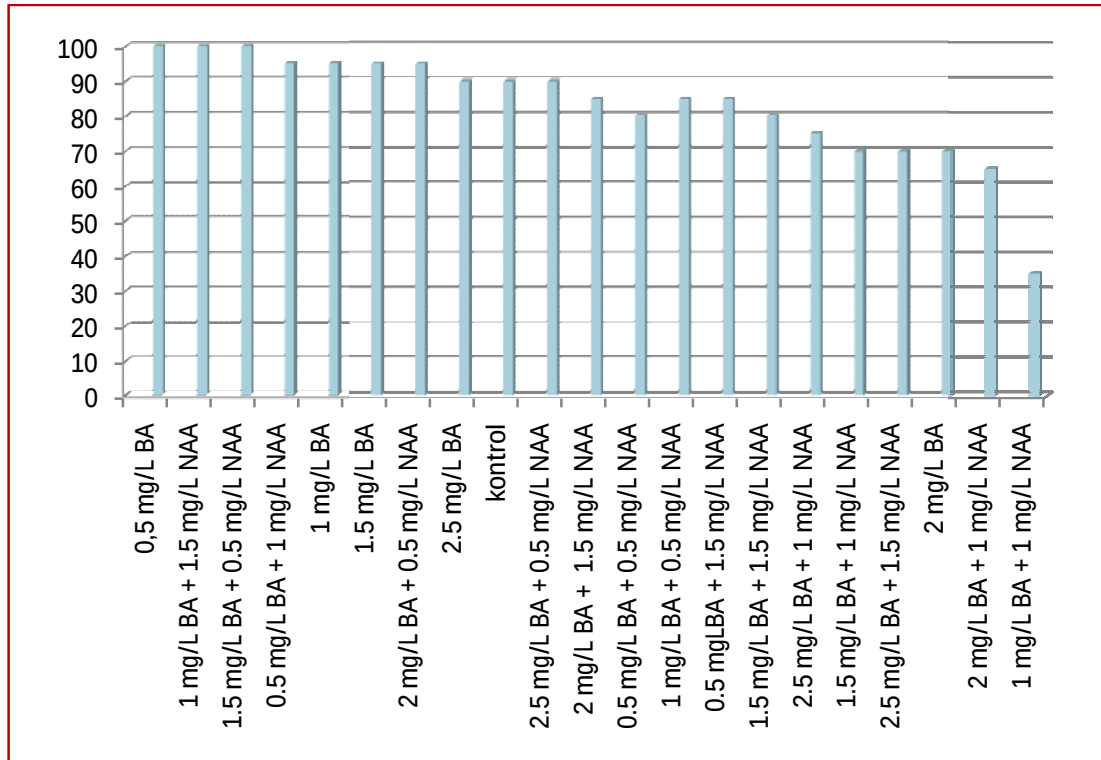
4.1.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Kallus Oluşumu

In vitro koşullarda çimlendirilen Tuzcu 31-31 turuncu tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Tuzcu 31-31 turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Tuzcu 31-31 turuncunda tüm konsantrasyonlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kallus oluşumu sağlayan en iyi besi ortamları sırasıyla 1 mg/L BA+1.5 mg/L NA; 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; 0,5 mg/L BA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir. Bunu 0.5 mg/L BA+1 mg/L NAA; 1 mg/L BA+1.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA içeren MS ortamları izlemiştir ($P<0.05$). Kallus oluşumu en düşük 1 mg/L BA+1 mg/L NAA ortamından elde edilmiştir. Tuzcu 31-31 turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri Şekil 4.3' te, bitki rejenerasyonuna ait görüntüler ise Şekil 4.4' te sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
0,5 mg/L BA	90.00	100
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	83.36	95
1 mg/L BA	83.36	95
1.5 mg/L BA	83.36	95
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	83.36	95
2.5 mg/L BA	80.19	90
Kontrol	80.19	90
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	80.19	90
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	77.30	85
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	74.14	80
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	73.55	85
0.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	73.55	85
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	70.38	80
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	67.50	75
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	64.33	70
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	60.86	70
2 mg/L BA	60.86	70
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	57.69	65
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	36.06	35



Şekil 4.3. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

BA \ NAA	0	0,5	1	1,5
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				
Kontrol				

Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 genotipinde elde edilen kalusların mikroskopta görünümü (10x10 kez büyütülmüş)

4.1.3. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarininde Kallus Oluşumu

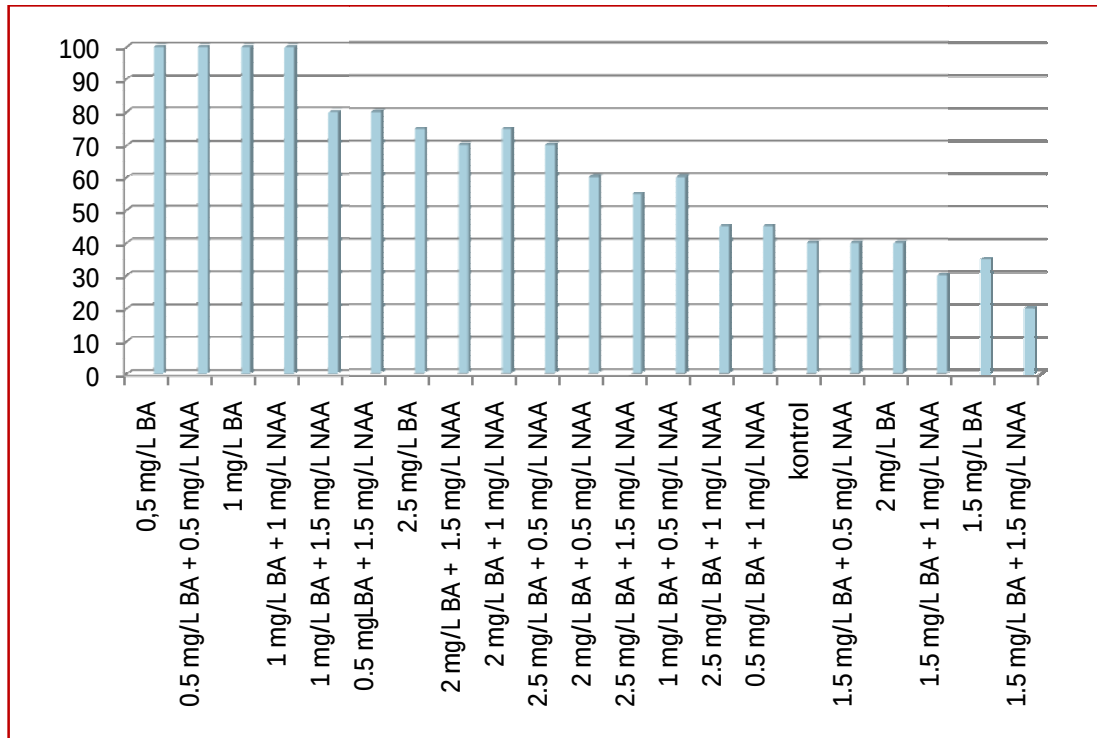
In vitro koşullarda çimlendirilen Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistik analizler sonucunda Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri Çizelge 4.3' de sunulmuştur.

Kleopatra mandarininde kallus oluşumu Carrizo sitranjı ve Tuzcu 31-31 genotiplerine göre düşük olmakla birlikte başarı oranı yüksek olmuştur. Konsantrasyonlar arası farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucunda kallus oluşumu en yüksek 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA; 1 mg/L BA + 1 mg/L NAA; 0,5 mg/L BA ve 1 mg/L BA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir ($P < 0.05$). Kallus oluşumu en düşük 1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA ortamından elde edilmiştir. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi Şekil 4.5' te, bitki rejenerasyonuna ait görüntüler ise Şekil 4.6' da sunulmuştur.

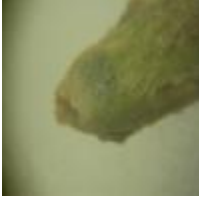
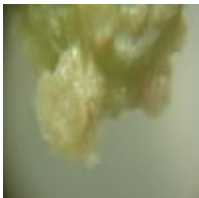
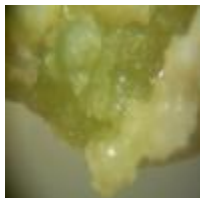
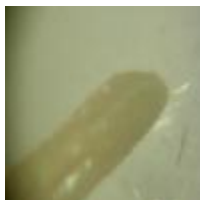
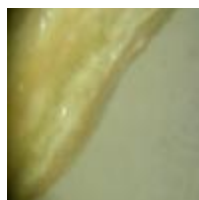
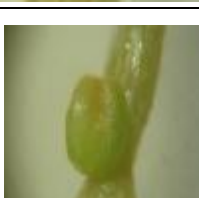
Çizelge 4.3. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
0,5 mg/L BA	90.00	100
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA	90.00	100
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	70.66	80
0.5 mg/LBA + 1.5 mg/L NAA	70.38	80
2.5 mg/L BA	67.50	75
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	64.61	70
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	64.02	75
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	60.86	70
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	54.81	60
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	48.16	55
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	47.58	60
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	42.11	45
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	38.95	45
Kontrol	38.95	40
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	35.19	40
2 mg/L BA	35.19	40
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	32.90	30
1.5 mg/L BA	28.55	35
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	15.86	20

LSD= 33.660



Şekil 4.5. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininin kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

BA \ NAA				
	0	0,5	1	1,5
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				
Kontrol				

Şekil 4.6. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarinindekök eksplantlarından elde edilen kallusların mikroskop görüntüleri (10x10 kez büyütülmüş)

4.1.4. Gou Tou Genotipinde Kallus Oluşumu

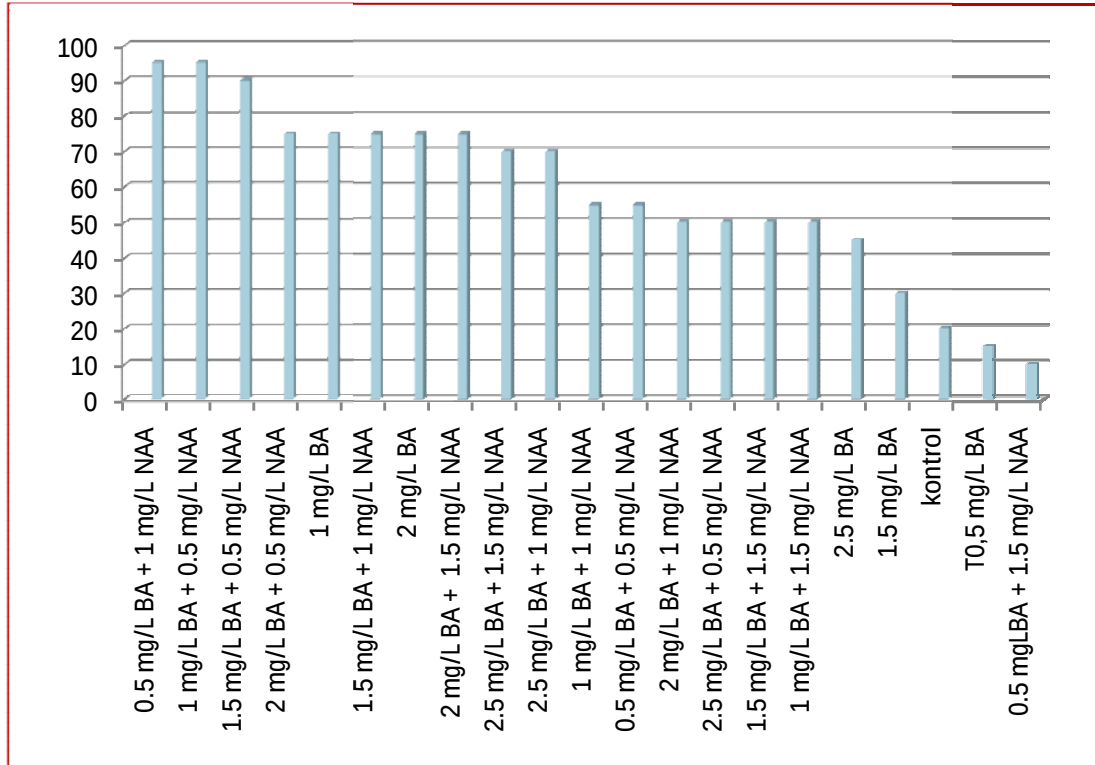
In vitro koşullarda çimlendirilen Gou Tou turuncunun tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Gou Tou turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri Çizelge 4.4' te sunulmuştur.

Genotipler arasında en düşük kallus oluşturma yüzdesi Gou Tou genotipinde görülmüştür. Konsantrasyonlar arası farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucunda kallus oluşumu en iyi 0.5 mg/L BA+1 mg/L NAA ve 1 mg/L BA+1 mg/L NAA, 0,5 mg/L BA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir. Bunu 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA içeren ortam izlemiştir ($P<0.05$). Kallus oluşumu en düşük az 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA ortamından elde edilmiştir. Gou Tou turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdelerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.7' te, bitki rejenerasyonuna ait görüntüler ise Şekil 4.8' de sunulmuştur.

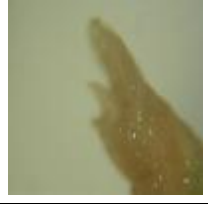
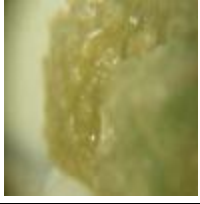
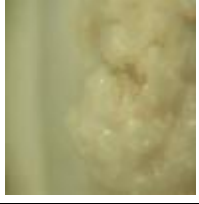
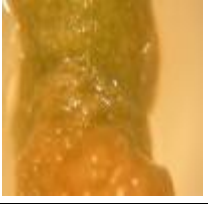
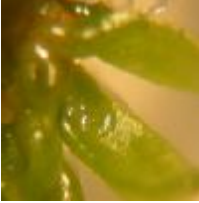
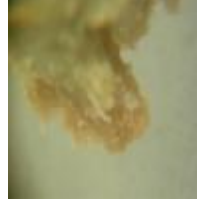
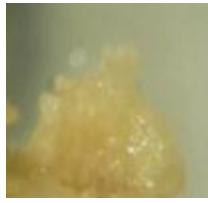
Çizelge 4.4.Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	83.36	95
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	83.36	95
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	76.72	90
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	67.50	75
1 mg/L BA	67.50	75
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	67.50	75
2 mg/L BA	67.50	75
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	64.02	75
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	60.86	70
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	60.86	70
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	51.64	55
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	51.64	55
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	45.00	50
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	45.00	50
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	45.00	50
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	41.52	50
2.5 mg/L BA	38.36	45
1.5 mg/L BA	29.42	30
Kontrol	19.61	20
0,5 mg/L BA	12.69	15
0.5 mg/LBA + 1.5 mg/L NAA	9.80	10

LSD= 48.737



Şekil 4.7. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi

BA \ NAA				
	0	0,5	1	1,5
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				
Kontrol				

Şekil 4.8. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kallusların mikroskop görüntüleri (10x10 kez büyütülmüş)

4.2. Genotiplerde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları

Tez çalışmamızda genotiplerden elde edilen kalluslar belirlenmiştir. Bunlar hakkındaki bilgi bir önceki bölümde verilmiştir. Bu kalluslardan sürgün oluşturma kapasitesine sahip kallus, rejenerasyon kapasitesi olan kallus olarak adlandırılmıştır. Rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşturma oranlarına ait veriler ve bilgiler bu bölümde değerlendirilmiştir.

4.2.1. CarrizoSitranjı Genotipinde Rejenerasyon Kapasitesi Olan KallusOluşum Oranları

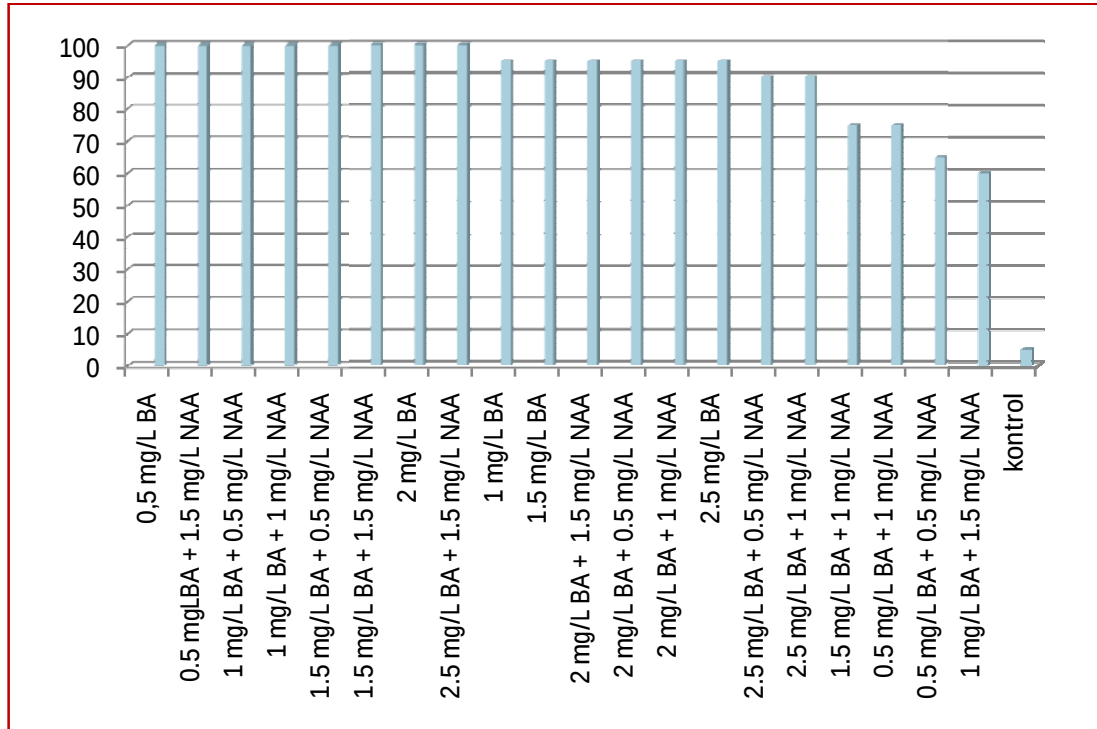
In vitro koşullarda çimlendirilen Carrizo sitranjının tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum yüzdeleri Çizelge 4.5' te sunulmuştur.

Bu genotipte rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum yüzdesi oldukça yüksek bulunmuştur. Konsantrasyonlar arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda başarı oranı en yüksek besi ortamları sırasıyla 0.5mg/L BA+1.5mg/L NAA; 1mg/L BA+0.5mg/L NAA; 1mg/L BA+1mg/L NAA; 0.5mg/L BA; 1.5mg/L BA+0.5mg/L NAA; 1.5mg/L BA+1.5mg/L NAA; 2mg/L BA ve 2.5mg/L BA+1.5mg/L NAA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir ($P<0.05$). Diğer konsantrasyonlarında başarı oranı yüksek olmakla birlikte en düşük başarı kontrol grubundan elde edilmiştir. Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum yüzdelerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.9' da sunulmuştur.

Çizelge.4.5. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
0,5 mg/L BA	90.00	100
0.5 mg/LBA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
2 mg/L BA	90.00	100
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	90.00	100
1 mg/L BA	83.36	95
1.5 mg/L BA	83.36	95
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	83.36	95
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	83.36	95
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	83.36	95
2.5 mg/L BA	83.36	95
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	80.19	90
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	76.72	90
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	67.50	75
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	60.27	75
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	57.97	65
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	51.05	60
Kontrol	6.64	5

LSD= 23.747



Şekil 4.9. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri

4.2.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları

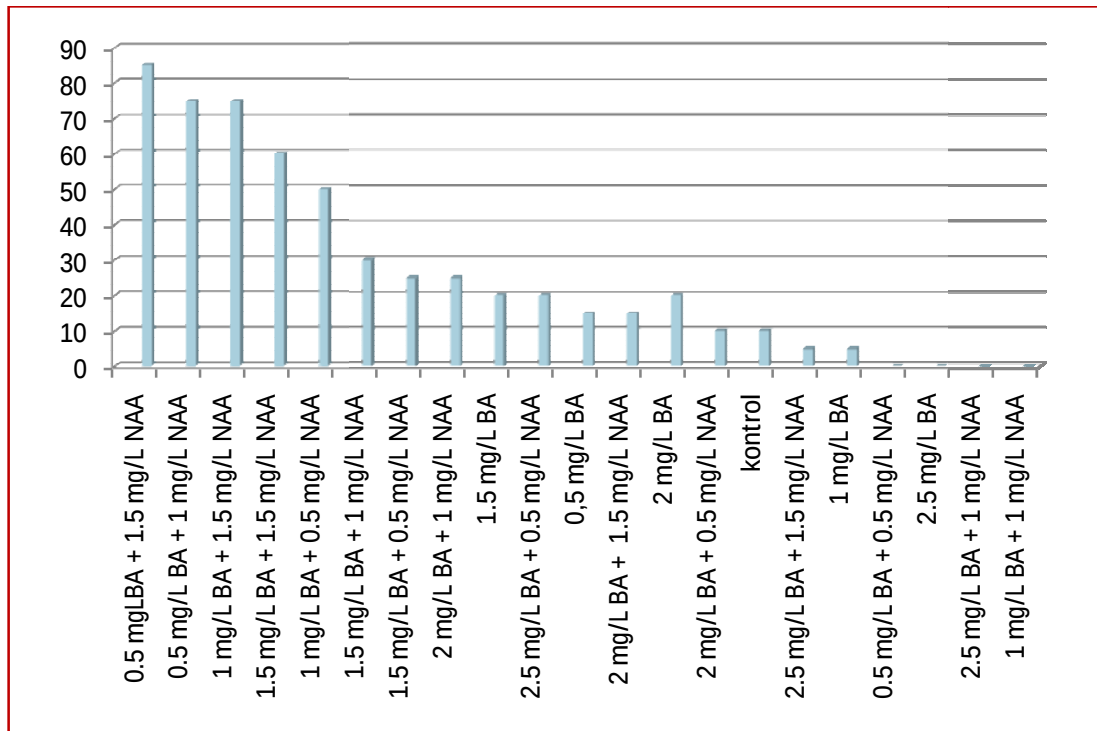
İn vitro koşullarda çimlendirilen Tuzcu 31-31 turuncunun tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında rejenerasyon oluşturma kapasitesi olan kallusların oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Tuzcu 31-31 turuncunun kök eksplantlarından elde edilen rejenerasyon kapasitesine sahip kallus yüzdeleri Çizelge 4.6' da sunulmuştur.

Bu genotipteki oluşum Carrizo sitranjı genotipine göre düşük bulunmuştur. Konsantrasyonlar arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda en yüksek oluşum 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Bunu 0.5 mg/L BA+1 mg/L NAA ve 1 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren MS ortamları izlemiştir ($P<0.05$). 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L; 2.5 mg/L BA; 2.5 mg/L BA+1 ve 1 mg/L BA+1 mg/L NAA içeren MS ortamlarında rejenerasyon kapasitesine sahip kallus gözlenmemiştir. Tuzcu 31-31 turuncunun kök eksplantlarından elde edilen rejenerasyon oluşturma kapasitesi olan kallus yüzdelerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.10' da sunulmuştur.

Çizelge.4.6. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde değerler
0.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	73.55	85
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	67.50	75
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	63.74	75
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	54.52	60
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	48.47	50
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	25.38	30
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	22.50	25
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	22.50	25
1.5 mg/L BA	19.33	20
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	19.33	20
0,5 mg/L BA	16.45	15
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	16.45	15
2 mg/L BA	15.86	20
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	13.28	10
Kontrol	9.80	10
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	6.64	5
1 mg/L BA	6.64	5
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.00	0
2.5 mg/L BA	0.00	0
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0

LSD= 35.421



Şekil 4.10. Tuzcu 31-31 genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi

4.2.3. Gou Tou Genotipinde RejenerasyonKapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları

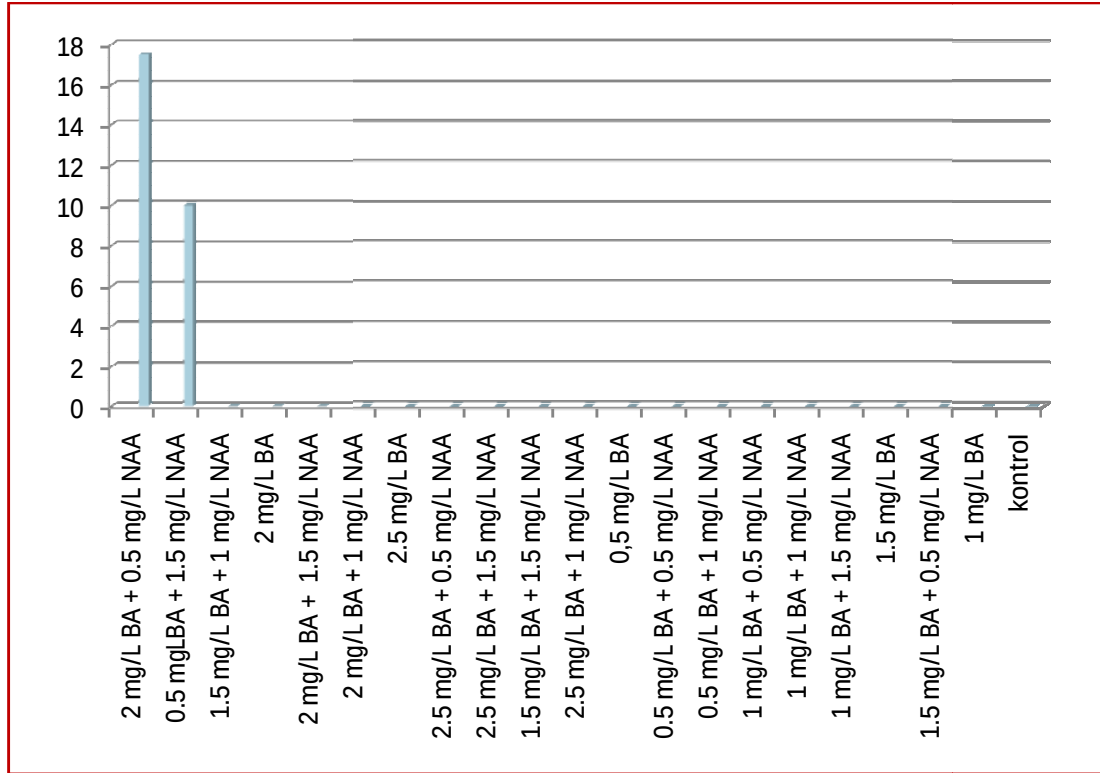
In vitro koşullarda çimlendirilen Gou Tou turuncunun tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Gou Tou turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri Çizelge 4.7' de sunulmuştur.

Bu genotipte rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşum oranı oldukça düşük kalmıştır. Konsantrasyonlar arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kaliteli kallus oluşumu sadece 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir ($P<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşumu gözlenmemiştir. Gou Tou turuncunun kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdelerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.11' de sunulmuştur.

Çizelge.4.7. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	17.89	17.5
0.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	9.80	10
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
2 mg/L BA	0.00	0
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	0.00	0
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
2.5 mg/L BA	0.00	0
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.00	0
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	0.00	0
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	0.00	0
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
0,5 mg/L BA	0.00	0
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.00	0
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.00	0
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	0.00	0
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	0.00	0
1.5 mg/L BA	0.00	0
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.00	0
1 mg/L BA	0.00	0
Kontrol	0.00	0

LSD= 9.085



Şekil 4.11. Gou Tou genotipinde kök eksplantlarından elde edilen kaliteli kallus yüzdelерinin grafiksel gösterimi

4.2.4. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Mandarininde Rejenerasyon Kapasitesi Olan Kallus Oluşum Oranları

In vitro koşullarda çimlendirilen Kleopatra mandarininin tohumlarından gelişen köklerden, tez kapsamında kullanılan farklı BA ve NAA kombinasyonlarında rejenerasyon kapasitesi olan kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Organogenesis çalışmalarında başarıyı etkileyen faktörler arasında; uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi, fiziksel çevre koşullarının kontrolü yer almaktadır. Işık, kültür ortamının önemli faktörlerinden birisidir ve *in vitro* organogenesiste etkili olduğu kesin olarak gösterilmiştir. Farklılaşma için gerekli olan ışık birkaç bileşenden oluşmuştur. Bunlar; ışığın şiddeti, gün içinde uygulama periyodu ve niteliğidir. Organogenesis

çalışmalarında, maksimum kallus gelişimi karanlıkta gerçekleşmektedir (Gürel ve Türker, 2002).

Yukarıda sözü edilen tüm bileşenler bu genotipte kök eksplantlarından rejenerasyon kapasitesi olan kallusların oluşumunu ve bu kalluslardan rejenerasyon sağlanmasında önemli faktörlerdir.

4.3. Genotiplerde Sürgün Oluşturma

Gerek *in vitro* gerekse *in vivo* organogenesisde bugün için önemli olan yaklaşımlardan birisi ‘plastisite’ veya ‘esneklik’ teorisidir. Buna göre organ oluşumunun erken safhalarında gelişme süreci esnek bir yol takip eder. Yani gelişmenin belli bir kritik dönemine kadar, meristemi meydana getiren hücre veya hücreler tarafsız davranır fakat daha sonra ortamdaki şartlara veya uyarıcılara göre, ya sürgün meristemi ya da kök meristemi olarak şartlanırlar ve arkasından da morfogenetik süreç sürgün veya kök olarak sonuçlanır (Gürel ve Türker, 2002).

Eksplantların ortama konulmasından belirgin bir organın ortaya çıkmasına kadar geçen süre içerisinde, üç ayrı aşamada değerlendirilebilecek bir dizi olaylar meydana gelmektedir. Bu aşamalar sırasıyla; 1-yeterlilik, 2-kararlılık, 3-morfolojik farklılaşmalardır. Yeterliliğin kazanıldığı birinci aşamada ortama konulan eksplant dokusu organogenik bir uyarım için belli bir yetenek diğer bir ifadeyle yeterlilik kazanır ve bu aşamada öncelikle olgun eksplant dokusunun tersine-farklılaşması gerçekleşir. Bu durumda, yeterliliğin kazanılması herhangi bir ortamda gerçekleşebilir. Bu ilk aşamanın sonunda organ oluşturmak için yeterlilik kazanan hücre ve hücrelerin belli bir gelişme tipi için şartlandırılmaları yani kararlı bir hale getirilmeleri gerekir. Bu işlemin gerçekleştirildiği süreç *in vitro* organogenesisde ki ikinci aşama olarak adlandırılır ve söz konusu gelişme tipinin belirlenmesinde, ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları önemli olmaktadır. Üçüncü ve son aşamada ise, morfolojik farklılaşma ve gelişme tamamlanarak belirgin organlar gözükmeye başlar ve bu gelişmenin tamamlanması, yine herhangi bir ortamda gerçekleşebilir. Yani ikinci aşama sonunda hücre veya hücreler herhangi bir organogenik yol için bir kere kararlı hale gelmişlerse artık

onların meydana getireceği organ tipini değiştirmek mümkün değildir (Christianson ve Warnick, 1985). Aşağıda tez kapsamında çalışılan genotiplere ait sürgüne dönüşme ile ilgili detaylar sunulmuştur.

4.3.1. Carrizo Genotipinde Sürgün Oluşumu

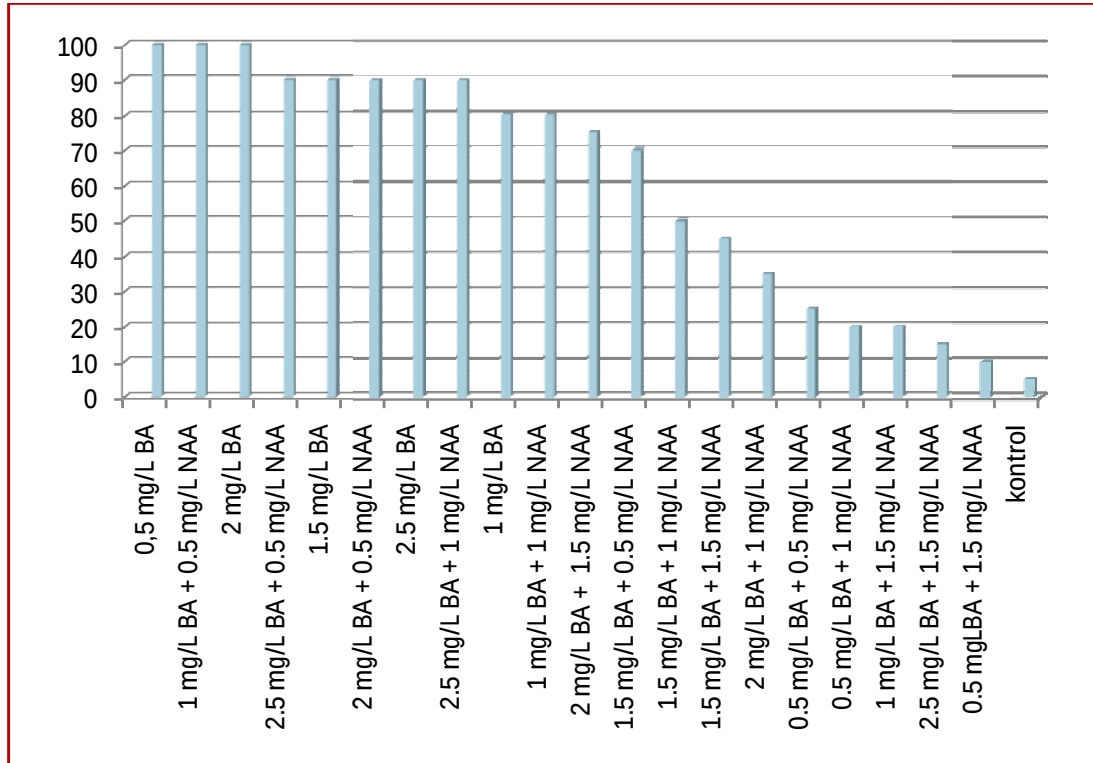
In vitro koşullarda çimlendirilen Carrizo sitranjının tohumlarından gelişen köklerden farklı BA ve NAA kombinasyonlarında sürgün oluşum oranları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdeleri Çizelge 4.8' de sunulmuştur.

Konsantrasyonlar arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda sürgün oluşumu en iyi 0.5 mg/L BA; 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir. Sürgün oluşumunda en az başarı ise 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA ve kontrol grubunda gözlenmiştir ($P<0.05$). Carrizo sitranjının kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdelerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.12' de sunulmuştur.

Çizelge.4.8.Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Transforme Edilmiş Veriler	Yüzde Değerler
0,5 mg/L BA	90.00	100
1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	90.00	100
2 mg/L BA	90.00	100
2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	80.19	90
1.5 mg/L BA	76.72	90
2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	76.72	90
2.5 mg/L BA	76.72	90
2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	76.72	90
1 mg/L BA	70.38	80
1 mg/L BA + 1 mg/L NAA	70.38	80
2 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	67.50	75
1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	60.86	70
1.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	45.00	50
1.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	38.36	45
2 mg/L BA + 1 mg/L NAA	32.31	35
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	25.97	25
0.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA	23.09	20
1 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	19.33	20
2.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	16.45	15
0.5 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA	13.28	10
Kontrol	6.64	5

LSD= 31.111



Şekil 4.12. Carrizo genotipinde kök eksplantlarından elde edilen sürgün yüzdelерinin grafiksel gösterimi

4.3.1.1. Carrizo Sitranjı Genotipinde Direkt Ve İndirek Oluşan Sürgünler

In vitro organ gelişimi, indirek organogenesis ve direkt organogenesis olmak üzere iki şekilde meydana gelir. İndirek organogenesis de; meristematik bir merkezin oluşumundan ve takip eden sürgün veya kök oluşumundan önce, alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşturulması için uyarılır. Direkt organogenesis de ise kallus gelişimi hiç görülmez.

Kallus dokusundan sürgün gelişimini şu şekilde özetlenebilir; İşlem eksplant çevresinde hücre dizilerinin oluşması ile başlar, hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde ise bazı trake elementleri ortaya çıkar. Kültürden bir hafta sonra trake elementlerinin yanında hücre bölünme bölgeleri başlar. Bu bölgenin içinde özellikle kallusun alt yarısında takip eden günlerde meristematik merkezler oluşur. Bu merkezler daha sonraki günlerde gözle görülebilir sürgün primordiyasını (taslağını) oluştururlar. En önce oluşan sürgünler ortama temas eden kallus yüzeylerinin geniş çıkıntıları üzerinde görülür, 18-21 günlük dokularda gözlenebilir. İşlem tamamen eşzamanlı (senkronize) olmamasına rağmen, sürgün oluşumuna sebep olacak temel olaylar 6-14 günlük kültür periyodu içinde olur. Burada anahtar olay, çok fazla vakuollü parankima hücrelerinin bölünmeye başlaması ve meristematik hücreleri oluşturmasıdır (Maeda ve Thorpe, 1979; Gürel ve Türker, 2002).

Bu genotipte oluşan sürgünlerin oluşum şekline baktığımızda kallusoluşturmadan direkt oluşan sürgünler (69 adet) ve kallustan oluşan indirek sürgünler (77 adet) elde edildiğini görmekteyiz. Direkt oluşan sürgünlerin yüzdesine baktığımızda en yüksek oranın %50 ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA konsantrasyonlarında olduğu görülmektedir.

İndirek oluşan sürgünlere baktığımızda %95 ile en yüksek oranın 0.5mg/L BA konsantrasyonunda daha sonra da % 45 oran ile 2.5mg/L BA+0.5 mg/L NAA' da gerçekleştiğini görüyoruz. Şekil 4.9. da sürgünlerin oluşum şekli ve yüzde oranları konsantrasyonlara göre verilmiştir.

Oluşan sürgünler *in vitro*da MS ortamı bulunan tüplere aktarılmış ve gelişmeleri beklenmiştir.

Çizelge 4.9. Carrizo genotipinde direk ve indirek oluşan sürgünlerin sayısı, yüzde değerleri

Konsantrasyonlar	Direk Sürgün (Adet)	Yüzde (%)	İndirek Sürgün (Adet)	Yüzde (%)
BA 0 mg/L + NAA 0 mg/L	1	5	0	0
BA 0.5 mg/L + NAA 0 mg/L	4	20	16	90
BA 0.5 mg/L + NAA 0.5mg/L	4	20	1	5
BA 0.5 mg/L + NAA 1 mg/L	1	5	0	0
BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	0	0	0	0
BA 1 mg/L + NAA 0 mg/L	7	35	4	20
BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L	2	10	3	15
BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L	5	25	1	5
BA 1 mg/L + NAA 1.5 mg/L	1	5	3	15
BA 1.5 mg/L + NAA 0 mg/L	4	20	4	20
BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L	4	20	3	15
BA 1.5 mg/L + NAA 1 mg/L	3	15	5	25
BA 1.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	2	10	1	5
BA 2 mg/L + NAA 0 mg/L	3	15	8	40
BA 2mg/L + NAA 0.5 mg/L	10	50	6	30
BA 2 mg/L + NAA 1 mg/L	2	10	1	5
BA 2 mg/L + NAA 1.5 mg/L	0	0	2	10
BA 2.5 mg/L + NAA 0 mg/L	3	15	4	20
BA 2.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L	10	50	9	45
BA 2.5 mg/L + NAA 1 mg/L	3	15	4	20
BA 2.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	0	0	2	10

4.3.1.2. Carrizo Sitranjı Genotipinde Rejenerasyonla Oluşan Sürgünlerden Elde Edilen Bitkicikler

Carrizo sitranjı anacında kök rejenerasyonu ile direk ve indirek yollarla elde edilen sürgünler sadece MS besi ortamı bulunan tüplere aktarılmış, 4. Haftanın sonunda gelişen bitkicikler tekrar alt kültüre alınmıştır. 4 hafta sonra gelişen bitkicikler *in vitro*da MS besi ortamı içeren macentalara aktarılmıştır. Tüplerde gelişen bitkilerin macentalara aktarımı sırasında her konsantrasyondan elde edilen bitkicik sayılmış ve Çizelge 4.10.' da gösterilmiştir. Macentalara aktarılan bitki sayısı

424 adet olarak bulunmuştur. Bu verilere baktığımızda en yüksek bitki sayısının (67 adet) , 0.5mg/L BA konsantrasyonunda olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.10.Carrizo genotipinde sürgünden elde edilen bitkicikler

Konsantrasyonlar	Bitkicik Sayısı (Adet)
BA 0 mg/L + NAA 0 mg/L	6
BA 0.5 mg/L + NAA 0 mg/L	67
BA 0.5 mg/L + NAA 0.5mg/L	7
BA 0.5 mg/L + NAA 1 mg/L	14
BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	1
BA 1 mg/L + NAA 0 mg/L	31
BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L	31
BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L	12
BA 1 mg/L + NAA 1.5 mg/L	4
BA 1.5 mg/L + NAA 0 mg/L	46
BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L	19
BA 1.5 mg/L + NAA 1 mg/L	21
BA 1.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	9
BA 2 mg/L + NAA 0 mg/L	27
BA 2mg/L + NAA 0.5 mg/L	41
BA 2 mg/L + NAA 1 mg/L	5
BA 2 mg/L + NAA 1.5 mg/L	3
BA 2.5 mg/L + NAA 0 mg/L	17
BA 2.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L	38
BA 2.5 mg/L + NAA 1 mg/L	11
BA 2.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L	14

Organogenesis çalışmalarında anahtar morfolojik özellik; meristematik merkezlerin oluşumudur. Direkt ve indirekt organogenesisin her ikisinde de meristematik merkezler vakuollü parankima hücrelerinden oluşmuşlardır. Bu hücreler yapı olarak küçük, ince duvarlı hücrelerdir ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin çekirdeklere sahiptirler. Histokimyasal olarak, hücrelerin DNA içeriğinde bir değişiklik gözlenmez. Fakat meristematik merkezlerin ve sürgün primordiyalarının oluşması esnasında ve öncesinde sürgün oluşma bölgelerinde RNA ve protein için daha yoğun boyama bölgeleri gözlenmiştir (Thorpe ve

Murashige, 1970).

Kökten bitki rejenerasyonu sonucunda Carrizo anacından elde edilen sürgünlerin tüpteki görünümü ve bu sürgünlerden oluşan bitkicikler Şekil 4.13’ de verilmiştir.



Şekil 4.13. Carrizo sitranjında kök rejenerasyonundan gelişen bitkicikler

4.3.2. Tuzcu 31-31 Genotipinde Sürgün Oluşumu

In vitro koşullarda çimlendirilen Tuzcu 31-31 turuncunun tohumlarından gelişen köklerden, tez kapsamında kullanılan farklı BA ve NAA kombinasyonlarında sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

4.3.3. Gou Tou Genotipinde Sürgün Oluşumu

In vitro koşullarda çimlendirilen Gou Tou turuncunun tohumlarından gelişen köklerden 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren MS ortamında sürgün gelişimi gözlenmiştir. tez kapsamında kullanılan diğer BA ve NAA kombinasyonlarında sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

4.3.4. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra Genotipinde Sürgün Oluşumu

In vitro koşullarda çimlendirilen Kleopatra mandarininin tohumlarından gelişen köklerden, tez kapsamında kullanılan farklı BA ve NAA kombinasyonlarında sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Organogenesis çalışmalarında başarıyı etkileyen faktörlerden biri besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileridir. Oksin ve sitokinin *in vitro* kültürde en fazla ihtiyaç duyulan iki bitki büyüme düzenleyicisidir. Ortamda bulunan sitokinin ve oksinin konsantrasyonu ve oranı *in vitro* büyümenin miktar ve çeşidini kontrol eder. Doğal olarak sentezlenen veya sentetik olarak kontrol edilen oksin ve sitokininler kullanılmaktadır. En fazla kullanılan oksinler 2,4 diklorofenoksi asetik asit (2,4- D), naftelen asetik asit (NAA), indol asetik asit (IAA) ve indol bütirik asittir (IBA)' tir. Kinetin ve N6 benzil adenin/benzil amino pürin (BA/BAP) en çok kullanılan sitokininlerdir (Chandler ve Thorpe, 1986; Gürel ve Türker, 2002).

Tez çalışmasında kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarininde kök eksplantlarından sürgün oluşumunun görülmemesinin nedeni, denemede kullanılan oksin ve sitokinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının bu genotip için uygun olmaması olabilir.

4.4. Kökten Bitki Rejenerasyonu Deneme Sonuçları

In vitro koşullarda çimlendirilen Kleopatra mandarininin tohumlarından gelişen köklerden, tez kapsamında kullanılan farklı BA ve NAA kombinasyonlarında sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

4.4.1. Genotiplerde Kallus Oluşum Oranlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen bitkilerin kök eksplantlarından kallus oluşturma oranları incelendiğinde; denemenin kontrol uygulamasında; tüm genotiplerde kallus oluşumu gözlenmiştir.

Denemede kullanılan genotipler arasındaki sayısal farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 genotipleri kallus oluşumu bakımından en yüksek değere sahip olmuştur. En düşük kallus oranı Gou Tou genotipinde görülmüştür. Besin ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli olmakla birlikte kullanılan besin ortamlarından 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, 1 mg/L BA ve 0.5 mg/L BA hormonlarını içeren besin ortamlarının sayısal olarak yüksek değerlere sahip olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).

Genel ortalamalar değerlendirildiğinde en iyi kallus oluşum yüzdesi Carrizo sitranjı (%90.73), Tuzcu 31-31 (%83.33), Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini (%62.87) ve Gou Tou (%58.33) olarak sıralanmıştır (Çizelge 4.11). Gou Tou genotipi hariç diğer üç genotipte ortak olarak en yüksek kallus oluşumu 0.5 mg/L BA içeren besin ortamında gözlenirken en yüksek kallus oluşumu Carrizo sitranjı anacında gerçekleşmiş ve bu genotipi Tuzcu 31-31 genotipi izlemiştir. Çalışmada NAA 0.5, 1, 1.5 mg/L oranında kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar NAA' nin artmasının kallus oluşumunun azalmasına neden olduğunu belirtmiştir. Bu araştırmacıların Kinnow mandarininde yaptıkları çalışmalarında ovül eksplantı kullanılarak maksimum kallus oluşumu % 31.94 ile 2mg/L Kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir (Singhveark.,2006)

Çizelge 4.11.Genotiplerin kallus oluşturma oranları

Genotipler	Kallus Oluşturma(%)
Carrizo Sitranjı	90.71
Tuzcu 31-31	83.33
Tuzcu Kleopatra	62.87
Gou Tou	58.33

Yapılan bir çalışmada kök kültürlerinin NAA ve BA içeren ortamda gelişimi gözlenmiştir. En yüksek bitki gelişimi 1mg/L NAA+5mg/L BA içeren besi ortamında *P. trifoliata* ve Carrizo sitranjı anaçlarında ve 1mg/L NAA+10 mg/L BA içeren ortamda *C. aurantium* anacında gözlenmiştir (Beloualy, 1991).

4.4.2. Genotiplerde Rejenerasyon Oluşturma Kapasitesine Sahip Kallus Oranlarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında kullanılan turunçgil genotiplerinin kök eksplantlarından rejenerasyon oluşturma Kapasitesine sahip kallusların oranları incelendiğinde; en yüksek oran Carrizo sitranjında görülmüştür. Bunu Tuzcu 31-31 genotipi izlemiştir .Gou Tou genotipinde sadece iki konsantrasyonda başarı elde edilmiş, Tuzcu Kleopatra genotipinde ise oluşum görülmemiştir.

Denemede en yüksek başarı yüzdesi sırasıyla Carrizo sitranjı (%88.09), Tuzcu 31-31 (%28.95) ve Gou Tou genotipi (%2.75) olmuştur (Çizelge 4.12). Tuzcu Kleopatra genotipinde başarı elde edilememiştir.(%0).Genotipler arasındaki sayısal farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.12.Genotiplerin rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus oranları

Genotipler	Kallus (%)
Carrizo Sitranjı	88.09
Tuzcu 31-31	25.95
Tuzcu Kleopatra	0
Gou Tou	2.75

Genel ortalamalar değerlendirildiğinde, en iyi rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus yüzdesi Carrizo sitranjı genotipinde görülürken; Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 ve Gou Tou genotiplerinde ortak olarak 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren konsantrasyon ortak olarak başarılı olmuştur.

Carrizo genotipinin kontrol uygulamasında oluşumunun en düşük oranda olup diğer konsantrasyonların hepsinde başarılı oluşması bu genotipin BA ve NAA besin ortamlarına olumlu tepki verdiğini göstermektedir.

Tuzcu 31-31 genotipinde en yüksek başarı oranı BA' m düşük, NAA' m yüksek olduğu ortam koşullarında görülmüştür. En düşük başarı oranı ise BA' m yüksek veya NAA' ya 0, NAA' m olmadığı ortamlarda görülmesi bu genotip için NAA' m olumlu sonuç verdiğini göstermektedir. Bu genotip için BA' m düşük NAA' m yüksek olduğu konsantrasyonlar önerilebilir.

4.4.3. Genotiplerde Sürgün Oluşum Oranlarının Değerlendirilmesi

Genotiplerin kök eksplantlarından sürgün oluşturma oranları incelendiğinde; en iyi sürgün oluşturma oranı Carrizo sitranjında (%60.95) görülmüştür. Gou Tou genotipinde sadece tek konsantrasyonda sürgün oluşmuştur (%0.23). Tuzcu Kıbrıs Kleopatra ve Tuzcu 31-31 genotiplerinde ise sürgün oluşumu görülmemiştir (Çizelge 4.13).

Carrizo sitranjının besin ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli

olmakla birlikte kullanılan besin ortamlarından en yüksek başarı elde edilen konsantrasyonlar 0.5 mg/L BA, 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA konsantrasyonlarında görülmüştür. Deneme ile ilgili verilere bakacak olursak BA'ın tek başına kullanılması veya NAA kombinasyonlarında BA'ın yüksek NAA'ın düşük konsantrasyonlarda kullanılmasının sürgün oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.13.Genotiplerin sürgün oluşturma oranları

Genotipler	Sürgün Oluşturma (%)
Carrizo Sitranjı	60.95
Tuzcu 31-31	0
Tuzcu Kleopatra	0
Gou Tou	0.23

Beloualy (1991), *C. aurantium*, *P. trifoliata* ve Carrizo sitranjı anaçlarından kallus kültürü ile bitki elde etmeye çalışmıştır. Epikotil kültürlerinden elde edilen kalluslarla somatik embriyo ve organogenesis yoluyla bitki elde edilmiştir. Epikotil ve kök kültürlerinin her ikisinin de NAA ve BA içeren ortamlarda gelişimi gözlenmiştir. En yüksek bitki gelişimi 1mg/L NAA+5mg/L BA içeren besi ortamında *P. trifoliata* ve Carrizo sitranjı anaçlarında ve 1mg/L NAA+10 mg/L BA içeren ortamda *C. aurantium* anacında gözlenmiştir.

Aka Kaçar ve ark., (2011), Carrizo sitranjı ve Kleopatra mandarininde kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarını kullanarak yapmış oldukları çalışmada MS ortamında (1 mg/L) BAP hormonunun farklı konsantrasyonları (0.0, 2.5, 5.0 mg/L) ile (0.5 mg/L)NAA kullanmış, en iyi rejenerasyonu Carrizo sitranjının kök eksplantlarında ve (2.5 mg/L)BAP ile (0.5 mg/L)NAA içeren ortamda elde etmişlerdir.

Gou Tou genotipinde sadece 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA kombinasyonunda sürgün oluşmuştur. Bu genotipte ve sürgün oluşmayan Tuzcu 31-31 ve Kleopatra

genotipinde; genotipe, besin ortamlarına, konsantrasyonlara, yetiştirme koşullarına bağlı olarak sürgün oluşumunun gerçekleşmediği düşünülebilir.

Bitki doku kültürü teknikleri, günümüzde bitki biyoteknolojisinin en önemli dallarından biridir. Buradaki temel güç, bu tekniklerin tek bir hücreye müdahale etme veya kontrol altına alma imkanını tanımasıdır. Bu nedenle doku kültürleri bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler biyolojide en çok başvurulan yöntem ve araçlar arasında yer almaktadır. Organogenesis çalışmaları, hücre ve dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıdığı için generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Diğer bir önemi de bitki transformasyon çalışmalarında başarıyı etkilemesidir. Çünkü optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde transformasyon yapmanın fazla bir anlamı yoktur. Organogenesisin en önemli dezavantajı ise, bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolünün olmayışıdır (Gürel ve Türker, 2002).

Bazı turuncgil anaçlarında kök eksplantlarından bitki rejenerasyonunun optimize edilmesini amaçlayan bu tez çalışmasında, Carrizo sitranjı genotipi için denemede kullanılan BA-NAA konsantrasyonları ve kombinasyonları olumlu cevap vermiştir. Gou Tou turuncunda sadece 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren MS ortamında rejenerasyon sağlanmıştır. Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini ve Tuzcu 31-31 turuncunda denemede kullanılan BA-NAA konsantrasyonları ve kombinasyonları olumlu cevap vermemiştir. Bu durum Carrizo sitranjının *in vitro* koşullarda çalışmaya daha uygun olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kullanılan diğer genotipler *in vitro* koşullarda inatçı genotipler olarak görülebilir. Bu sonuçlar, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarini ve Tuzcu 31-31 turuncunun kök eksplantlarından bitki elde edilmesinin gerçekleşebilmesi için farklı oksin-sitokinin konsantrasyonları ve/veya kombinasyonlarının, farklı besi ortamlarının kullanılması gerektiğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu tez çalışması bodur anaç ıslahı projesinin ilk aşaması olan kökten bitki rejenerasyonunun optimize edilmesi amacını taşımaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar;

Carrizo sitranjı genotipinde tüm konsantrasyonlarda kallus oluşumu gözlenmiş, en iyi kallus oluşturma oranları bu genotipte görülmüştür. Kallus oluşturma oranları Carrizo sitranjından sonra en yüksek oranda Tuzcu 31-31 genotipinde görülmüştür.

Carrizo sitranjı genotipinden elde edilen kalluslar yeşil, sıkı yapılı, parlak görünümde olmuştur. Tuzcu 31-31 genotipinde ise kahverengi, gevşek yapılı, dolgun ve mat görünümde olmuştur, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra mandarinindeki yapıda, Tuzcu 31-31 gibidir, kallus ince yapıda oluşmuştur. Gou Tou genotipinde kallus küçük, kahverengi– yeşil karışık görünümde ve gevşek yapılı olmuştur.

En yüksek kallus oluşumu Gou Tou genotipi hariç diğer 3 genotipte ortak olarak 0.5 mg/L BA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda kallus oluşumunu teşvik amacıyla 0.5 mg/L BA içeren besin ortamı önerilebilir.

Gou Tou genotiplerinde gözlenen düşük kallus oluşum oranlarının genotipe bağlı olabileceği düşünülmekle beraber bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu genotiplerde daha yüksek kallus oluşumunun sağlanması amacıyla farklı besi ortamları, farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonları ve kombinasyonları denenmelidir.

Tez kapsamında kullanılan turuncgil genotiplerinde rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus oluşturma oranları Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 ve Gou Tou genotiplerinde ortak olarak 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren konsantrasyonda başarılı olmuştur. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda bu genotipler için öncelik olarak 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA içeren besin ortamı önerilebilir.

Tuzcu 31-31 genotipinde en yüksek oranının; BA' ın düşük, NAA' ın yüksek olduğu ortam koşullarında görülmesi, daha sonra yapılacak çalışmalarda,

bu genotip için BA' ın düşük ve NAA' ın yüksek olduğu konsantrasyonların kullanılmasını öngörmektedir.

Gou Tou genotipinde gözlenen düşük oluşum oranı ve Tuzcu Kıbrıs Kleopatra genotipinde çalışmada kullanılan farklı BA ve NAA kombinasyonlarında rejenerasyon oluşturma kapasitesine sahip kallus oluşmamasının genotipe bağlı olabileceği düşünülmekle beraber bundan sonra yapılacak çalışmalarda farklı besi ortamları, yetiştirme şartları ve farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının denenmesi önerilebilir.

Carrizo sitranjında en yüksek sürgün oluşturma oranları 0.5 BA mg/L; 1mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA konsantrasyonlarında olmuştur. Bu genotipte kök rejenerasyonunda sürgün oluşumu için yapılacak çalışmalarda BA' ın tek başına veya BA' ın yüksek NAA' ın düşük oranlarda kullanılması uygun olacaktır.

Carrizo sitranjında kök rejenerasyonu çalışması ile elde edilen sürgünlerden besin ortamına aktarılan bitkicik sayısı en fazla 0.5 mg/L BA; 1.5 mg/L BA ve 2 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamlarında gerçekleşmiştir. Bu genotipte kök rejenerasyonundan sürgün elde etme ve bu sürgünlerden bitkicik elde etme çalışmalarında BA ' ın tek başına veya BA' ın yüksek NAA' ın düşük olduğu konsantrasyonların kullanılmasının uygun olacağı öngörülmektedir

Tuzcu 31-31, Tuzcu Kıbrıs Kleopatra ve Gou Tou genotiplerinde farklı besin ortamları (oksinlerden 2ip, KI, TDZ) kullanılarak çalışmalar sürdürülmelidir. Farklı kombinasyonlar (oksinlerinde BA yı tek başına kullandığımız şekilde sitokinin olmadan kullanılması) denenmelidir.

Çalışmamızda 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olarak kullandığımız ışık şartlarının, sadece karanlık veya sadece aydınlık olarak denenmesi sürgün oluşumunun sağlanması açısından önerilir. Kullandığımız tohumlar olgun meyvelerden alınmış olup, olgunlaşmamış meyvelerinin tohumlarının denenmesi de alternatif olabilir.

KAYNAKLAR

- AGRAWAL, S., CHANDRA, N., KOTHARI, S.L., 1989. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. mathania). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16:47-55
- AKA KAÇAR, Y., MENDİ, ŞİMŞEK, Ö., BONCUK, M., 2011. *In Vitro* Plant Regeneration of ‘Carrizo’ Citrange and ‘Cleopatra’ Mandarin by Organogenesis. Proc. IInd IS on Citrus Biotechnology Eds.: A. Gentile and S. La Malfa. Acta Hort. 892, ISHS
- AKGÜN, C., 2006. <http://kobi.mynet.com/pdf/turuncgiller.pdf>
- ANONİM, 2008. http://citrusfruits.files.wordpress.com/2007/08/rekolte_narenciye2
- ANONİM, 2013 a. <http://www.batem.gov.tr>
- ANONİM, 2013 b. <http://users.kymp.net/citruspages>
- FAO, 2008. <http://www.fao.org>
- FAO, 2010. <http://www.fao.org>
- AVENIDO, R.A., ENDONELA, L.E., PATEÑA, L.F., BARBA, R.C., 2005. Developing Plant Regeneration Systems for in Vitro Conservation of Mandarin (*Citrus reticulata*) and Pummelo (*Citrus maxima*). ISHS Acta Horticulturae 694: International Symposium on Harnessing the Potential of Horticulture in the Asian-Pacific Region.
- BEGUM, F., AMIN, M.N., ISLAM, S., AZAD, M.A.K., 2004. A comparative Study of Axillary Shoot Proliferation from the Nodal Explants of Three Varieties Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.). Biotechnology, 3 (1):56-62.
- BELOUALY, N., 1991. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: 29-34
- BLONDEL, W.P., 1967. Quelques Aspects du Remplacement du Bigaradier
- BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S., MALIK, S.K. 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. Plant Cell Reports. 14 (6): 398-402.

- BİÇEN, B., 2008. Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Eksplant Kaynağı ve Besi Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi s:87
- BORDON, Y., GUARDIOLA, J.L. and GARCIA-LUIS, A., 2000. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of Epicotyl Segments of *Citrus* Rootstocks. *Annals of Botany* 86: 159-166, 2000.
- CARIMI, F., PASQUALE, F.D., CRESCIMANNO, F.G. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Reports* 18: 935-940
- CARIMI, F., TORTORICI, M.C., PASQUALE, F.D., CRESCIMANNO, F.G., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/ style eksplant of sweet orange navel group (*Citrus sinensis* (L.) Osb.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 183- 189, 1998.
- CASTLE, W. S. 1984. Choosing a Rootstocks for Citrus. *The Citrus Industry*. 65 (1): 20-28.
- CHAKRAVARTY, B., GOSWAMI, B. C., 1999. Plantlet Regeneration from Long-Term Callus Cultures of *Citrus acida* Roxb. and the Uniformity of Regenerated Plants. *Scientia Horticulture* 82 (1999): 159-169
- CHANDLER, S. F., THORPE, T. A., 1986. Hormonal regulation of organogenesis *in vitro*. In: Purohit SS (ed), *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*, Vol. 3, s. 1-27, Agro Botanical Publishers, India.
- CHEN, M.H., WANG, P.J., MAEDA, E., 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. Tissue culture derived from root explants. 6 (5): 348-351
- CHRISTIANSON, M.L., WARNICK, D.A., 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *Dev. Biol.*, 112:494-497
- DAVIES, F., S. VE ALBRIGO, L., G., 1994. Rootstocks. In: Athern, J., Rees. A. (Eds.), *Citrus*. CAB International, Wallingford, UK, 254p.

- DEMİRKEŞER, T. H., 1993. The Effects of “TUZCU” Sour Orange Clones Selected From the Eastern Mediterranean Region on the Fruit Yield and Quality of Kütdiken Lemon. (in Turkish with English summary) MSc. Thesis. 93 p. Adana.
- ERNER, Y., REUVENI, O., GOLDSCHMIDT, E.E., 1975. Partial Purification of a Growth Factor from Orange Juice Which Affects citrus Tissue Culture and its Replacement by Citric Acid. *Plant Physiol.* (1975) 56, 279-282
- FIGLIORE, S., DE PASQUALE, F., CARIMI, F., SAJEVA, M., 2002. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on Somatic Embryogenesis from Stigma and Style Transverse Thin Cell Layer of Citrus. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cul.* 68/1 : 57-63.
- FORD, H.W. 1966. Rootstocks for Spreading Decline Araes. Citrus station Mimeo Report CES. Lake Alfred, Florida. 66 (11): 1 – 7.
- GARDNER, F.E. and G.E. HORANIC, 1961 a. A Comparative Evaluation of Rootstocks for Valencia and Parson Brown Oranges on Lakeland Fine Sand. *Proc. Florida Sta. Hort. Soc.* 74: 123 – 127.
- GARDNER, F.E. and G.E. HORANIC, 1961 b. Evaluation of Citrus Rootstocks for Florida. *Citrus and Vegetable Magazine*, 24 (10): 12, 26, 27, 30
- GILL, M.I.S., SINGH, Z., DHILLON, B.S., GOSAL, S.S., 1995. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Mandarin (*C. reticulata* Blanco). *Sci. Hort.* 63 (3-4) P. 167-174.
- GOH, C., J., SIM, G., E., MORALES, C., S., LOH, C., L., 1995. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 43, ,301-303.
- GÜREL, E., TÜRKER, A., U., 2002, Bitki Biyoteknolojisi 1, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Organogenesis, Bölüm 2:36-70
- HAQUE, M. S., TOMIKICHI, W., KAZUMI, H., 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , Vol. 50 (2): 83-89
- JACKSON, L . K., 1985. Citrus Rootstocks. *The Citrus Industry.* 66 (9): 18-23.
- KARAHOCAGİL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.

- KOCHBA, J., SPIEGEL-ROY, P., NEUMANN, H., SAAD, S., 1978. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular by ABA, ethephon, CCC and its suppression by GA₃. *Z. Pflanzenphysiol* 89: 427-432.
- KOMAI, F., OKUSEB, I., HARADAA, T., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Tissue Culture*, Plant Science. Vol. 113 (2):203-208
- MAEDA, E., THORPE, T.A., 1979. Shoot histogenesis in tobacco callus cultures. *In vitro*, 15: 415-424
- MUKTHAR, R., KHAN, M., FATİMA, B., ABBAS, M. and SHAHİD., 2005, *In vitro* regeneration and multiple shoots induction in *Citrus reticulata* (Blanco), *Int. J. Agri. Biol.*, 7.
- MURASHIGE, T. ve SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- NİTO N. And IWAMASA M. 1990. *In vitro* plantlet formation from juice vesicle callus of satsuma (*Citrus Unshiu* Marc.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 137-140
- OLLITRAULT, P, TALON., M, LOTFY., S, BELFALAH, Z, MIMOUN, M. B., YEŞİLOĞLU., T, 2006. Genomic And Molecular Physiology Of Citrus Tolerance To Abiotic Stresses; A Strong Component Of The Euromediterranean Initiative CIBEWU 6th PCRD INCO MPC Project On Rootstock Breeding For The Mediterranean Basin, *Plant & Animal Genomes XV Conference*.
- ÖZCAN, M. ve M. ULUBELDE, 1984. Turunçgil Anaçları. Tarım Orman ve Köyşleri Bakanlığı Proje ve Uygulama Genel Müdürlüğü. Ege Bölgesi Ziraî Araş. Ens. Yayınları, No: 50, 37 s. Menemen.
- SAUNT, J., 2000. *Citrus Varieties of the World*. Sinclair Int. Limited, Norwich, England.
- SINGH, B., SHARMA, S., RANI, G., VIRK, G. S., ZAIDI, A. A and NAGPAL, A., 2006. *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora). *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (16), pp. 1470-1474

- SRIVASTAVA, D.R., ANDRIANOV, V.M., PIRUZIAN. E.S., 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. Cv. Melitopolski). Plant Cell Reports Vol.8 (5), pp. 300-302
- ŞİMŞEK, Ö., 2009. Bazı Turunçgil Anaçlarında Demir (Fe) Klorozuna Dayanıklılıktan Sorumlu Genlerin Sscp Markılarıyla Allelik Çeşitliliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.TAO 2002
- TAO, H., SHAOIN, P., GAOFENG, D., LANYING, Z., and GENGGUANG, L., 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell Tiss. Organ Cult.69:141-1 46
- THORP, T.A.,MURASHIGE, T.,1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. Can. J. Bot., 48: 277-285
- TUZCU, Ö., 1978. Turunçgillerde Anaç ve Sorunları. Çağdaş Tarım Tekniği, 3:31-35
- TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., YILDIRIM, B., 2001. Citrus 2001 Reports: Turkey. Florida Grower Annual Edition. Mid.
- UZUN,A., 2002. Turunçgil Anaçları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı .Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, ALATA Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Yayınları.
- YEŞİLOĞLU, T., 1982. Doğu Akdeniz Bölgesinde Selekte Edilen Turunç Klonlarının Morfolojik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, yayımlanmamış.
- YEŞİLOĞLU, T., 2007. Turunçgil Ders Notları. Adana (Yayımlanmamış)

ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Adana’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’ da tamamladı. 1985 yılında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’ ne girdi.

1989 yılında mezun oldu. Aynı yıl Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’ nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 1993 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamlayamadan bıraktı. 1996 yılında öğretmenliğe başladı. 2011 yılında afaan faydalanarak Yüksek Lisans öğretime geri döndü. Halen Seyhan Cumhuriyet İlkokulu’ nda öğretmenlik yapmaktadır.