

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÖZLEM

**‘AZMAN’ VE ‘GRAND NAİNE’ MUZ ÇEŞİTLERİNDE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS YÖNTEMİ İLE BİTKİ
REJENERASYONU VE GENETİK KARARLILIĞININ
BELİRLENMESİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**‘AZMAN’ VE ‘GRAND NAİNE’ MUZ ÇEŞİTLERİNDE SOMATİK
EMBRİYOGENESİS YÖNTEMİ İLE BİTKİ REJENERASYONU VE
GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Merve ÖZLEM

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2022, Sayfa: 105
Jüri : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ
: Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK

Muz, dünya’da tropik ve subtropik iklim kuşağında yer alan ihracat ve ithalat hacmi en yüksek meyve gruplarından biridir. Muz bitkisinin, *in vitro* koşullarda somatik embriyogenesis yöntemi ile çoğaltılması klonal ve kitlesel üretim açısından önemlidir. Bu çalışmada; ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ muz çeşitlerine ait olgunlaşmamış dişi ve erkek çiçek tomurcukları kullanılarak somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu ve SSR markır sistemleri ile genetik kararlılığının saptanması amaçlanmıştır. Kallus gelişimini indüklemek ve somatik embriyo elde etmek amacıyla kurulan *in vitro* rejenerasyon denemelerinde; 2,4-D (0,5,1,0, 2,0 mg/l), BAP (0,05 mg/l) ve Pikloram (0,5, 1,0 mg/l) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Çalışmada, ‘Azman’ çeşidi için 1,0 mg/l 2,4-D (%79,33), ‘Grand Naine’ çeşidi için 2,0 mg/l 2,4-D (%77,15) ortamı başarılı bulunmuştur. Çalışma boyunca histolojik analizler ile somatik embriyoların varlığı ve gelişimi tespit edilmiştir. Tez çalışması sonunda elde edilen muz bitkileri seraya aktarılmıştır. SSR markırları ile yapılan DNA analizlerinde kullanılan primerlerde, ana bitkilerle somatik embriyolardan elde edilen bitkiler arasında herhangi bir genetik açılımın olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Muz, somatik embriyogenesis, histolojik analiz SSR genetik kararlılık

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF PLANT REGENERATION AND GENETIC STABILITY BY SOMATIC EMBRYOGENESIS IN 'AZMAN' AND 'GRAND NAINE' BANANA CULTURES

Merve ÖZLEM

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2022, Pages: 105
Jury : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ
: Assoc Prof. Dr. Özhan ŞİMŞEK

Bananas are one of the most important fruit groups with the highest export and import volume in the tropical and subtropical climate zones of the world. Propagation of banana plant by somatic embryogenesis method in *in vitro* conditions is important in terms of clonal and mass production. This study is aimed at plant regeneration by the somatic embryogenesis method by using immature female and male flower buds of 'Azman' and 'Grand Naine' banana cultivars, which are widely grown in our country, and to determine their genetic stability with SSR marker systems. *In vitro* regeneration attempts to induct the development of the callus and obtain a somatic embryo in an MS nutrient environment including different concentrations and combinations of plant growth regulators 2,4-D (0.5, 1.0, 2.0 mg/L), BAP (0,05 mg/L), and Pikloram (0.5, 1.0 mg/L). In this experiment, CL-1-2 (79,33%) medium for the 'Azman' variety and CL-1-3 (77,15%) medium for the 'Grand Naine' variety were found to be successful. During the study, histological analysis and the presence and development of somatic embryos were detected. As a result of the study, embryos formed in MS nutrient media containing 1.0 mg/l 2,4-D (65%) for the 'Azman' variety and 2.0 mg/l 2,4-D (62,5%) for the 'Grand Naine' variety, the plant was transformed. Banana plants obtained at the end of the thesis study were transferred to the greenhouse. As a result of DNA analysis with SSR markers, it was determined that there was no genetic variation in plants that developed with the germination of somatic embryos.

Key-words: Banana, somatic embryogenesis, histology analysis, SSR genetic stability

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Muz, Dünya’da tropik ve subtropik iklim kuşağında yer alan yaklaşık 150 ülkede ekonomik olarak yetiştirilen, ihracat ve ithalat hacmi yüksek olan önemli meyve gruplarından biridir. Muzlar vejetatif olarak rizom ve rizom gövde üzerinden çıkan yavru bitkiler ile çoğaltılmaktadır. Fakat bu materyaller bazı patojenlerden ve nematodlarla enfekte olmakta ve farklı zamanlarda geliştikleri için homojen olmamakta ve bu durum yetiştiriciliği sınırlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, doğrudan organogenesis (DO) veya somatik embriyogenesis (SE) yoluyla elde edilen *in vitro* rejenere bitkiler, tropik bölgelerde muz ve muz materyallerinin çoğaltılması için tavsiye edilir çünkü bu yöntemlerle yapılan yetiştiricilikte elde edilen bitkiler, birörnek büyüme gösterir ve daha verimlidir. Somatik embriyogenesis, *in vitro* çoğaltma tekniklerinden biridir ve haploid veya diploid yapıları somatik yapılardan bir dizi embriyojenik çalışmalarla birlikte embriyo elde edilmesidir. Ticari önemi olan türler için hızlı ve birörnek çoğaltım ve üretim için büyük önem taşıyan bu teknik ile çalışılan tek bir eksplanttan sınırsız sayıda embriyo üretilebilir. Hücre süspansiyonu tekniği ise embriyo elde etme konusunda az iş gücü ile kısa zamanda daha fazla başarılı sonuç vermektedir.

Tez çalışmasında, sürgün ucu yöntemi ile klonal çoğaltmada eksplant bulma zorlukları ve kontaminasyon riskinin yüksek olması dolayısı ile ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ muz çeşitlerinde, farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler kullanılarak somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Altkültürler boyunca oluşan kalluslarda ve somatik embriyogenesis aracılığı ile elde edilen bitkilerde önemli parametrelere bakılarak en iyi embriyo elde etme ve bitkiye dönüşüm protokolünün optimize edilmesi hedeflenmiştir. Başlangıç materyalleri ile somatik embriyolardan elde edilen bitkilerde genetik kararlılığının belirlenmesi için SSR markır sisteminin ile DNA analizleri gerçekleştirilmiştir.

Somatik Embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu sağlamak amacıyla yapılan denemelerde, 'Azman' ve 'Grand Naine' çeşitlerine ait olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Giriş ortamında 0,175 mg/l IAA ve 0,550 mg/l TDZ ile desteklenmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Kallus oluşumu için kültürler, karanlık koşullar altında $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Kültüre alınan olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları 4 haftada bir olacak şekilde 3 kez altkültüre alınmıştır. Altkültür sırasında gözlemlenen yüzde kallus oluşumları, 'Grand Naine' olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarında %58,75, 'Azman' olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarında %32,6 olup ortama yanıt veren eksplantlar yaklaşık 3 haftada kallus oluşturmuştur. 'Grand Naine' ve 'Azman' olgunlaşmamış dişi çiçek eksplantlarının altkültürler boyunca salgıladığı fenolik madde önlenemediği için gelişim göstermemiştir.

Tez kapsamında kallus gelişimini indüklemek için belirlenmiş olan deneme deseninde 'Azman' ve 'Grand Naine' eksplantları, yalnız 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) içeren MS besin ortamında ve BAP(0,5 mg/l) ve Pikloram (0,5, 1,0 mg/l) konsantrasyon/kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında optimize edilmiştir. Yapılan çalışmada, kalluslar ilk haftadan itibaren gelişim göstermiş olup farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda, ilk haftalarda yumuşak, dağılgan yapıda olup rengi saydam-beyaz iken ilerleyen zamanlarda ağırlıklı olarak krem-kahve renkte, yapıları 2,4-D içeren besin ortamlarında yumuşak ve dağılmayan (kompakt) formda, BAP-Pikloram konsantrasyon/kombinasyonlarını içeren besin ortamlarında müsilaçlı, orta sert ve dağılgan formda olduğu gözlemlenmiştir. 'Azman' erkek çiçek eksplantları için en başarılı kallus geliştirme ortamı, %79,33 ile CL-1-2 (1,0 mg/l 2,4-D) olarak belirlenmiştir. 'Grand Naine' erkek çiçek eksplantlarında, %77,15 ile CL-1-3 (2,0 mg/l 2,4-D), %75,85 ile CL-1-2 (1,0 mg/l) olarak tespit edilmiştir.

Kallus geliştirme ortamında elde edilen embriyojenik kallus ve somatik embriyolar çoğaltılmak amacıyla 0,05 mg/l BAP+ 1,0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 'Azman' çeşidine ait olgunlaşmamış erkek

çiçek eksplantlarında somatik embriyo oluşumunda en başarılı ortam %65 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) olarak belirlenmiştir. 'Grand Naine' olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarında %62.5 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) olarak tespit edilmiştir. Somatik embriyolar oluşmadan önce koyu kahverengiye dönüşen embriyojenik kallusların, farklılaşarak üzerinde, saydam ve beyaz renkte proembriyonik yapılar şeklinde oluştukları gözlemlenmiştir. Proembriyonik yapılar farklılaşarak 2 hafta içerisinde globular embriyoya dönüşmüşlerdir. Oluşan embriyojenik kallusların yaklaşık 8-12 hafta sonra embriyoya dönüşümü gerçekleşmiştir. 'Azman' ve 'Grand Naine' çeşitlerine ait somatik embriyolar çimlendirilmek üzere hormon içermeyen MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Hormonsuz MS ortamında gelişen bitkilerde; kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm), yaprak sayısı (adet), bitki boyu (cm) ve yalancı gövde uzunluğu (cm) parametrelerine ait veriler alındıktan sonra aklimatizasyon işlemine geçilmiştir. Seraya aktarılan bitkilerin yaşama oranı, 'Azman' çeşidi için %87,5, 'Grand Naine' çeşidi için ise %85 olarak tespit edilmiştir. Verileri alınan parametrelerle yapılan istatistiksel analizler sonucunda kök sayısı için, genotip ve ortamlar arasında istatistiki açıdan fark görülmemiş olup en fazla kök sayısının 18,32 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) ortamındaki 'Azman' çeşidine ait olduğu tespit edilmiştir. Kök uzunluğu ile ilgili verilere baktığımızda, ortam ile ilgili verileri inceleyecek olursak CL-1-3 besin ortamının kök uzunluğu 5,29 cm ile istatistiksel olarak daha fazla olarak tespit edilmiştir. Çeşit ortalaması verilerine göre en iyi çeşit 5,29 cm kök uzunluğu ile 'Grand Naine'dir. Çeşit*ortam interaksiyonuna bakıldığında, CL-1-3 ortamındaki 'Grand Naine' bitkilerinin kök uzunluğu 10,59 cm ile 'Azman' bitkilerinin kök uzunluğundan daha fazladır. Yaprak sayısına ait verilerin istatistiki analizi bulgularına bakıldığında ortam, çeşit ve çeşit*ortam interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,05$). En fazla yaprak sayısı 8.08 ile CL-1-3 ortamındaki 'Grand Naine' çeşidine aittir. Bitki boyuna ait verilerin istatistiksel analizi bulgularına bakıldığında ortam, çeşit ve çeşit*ortam interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,05$). 'Azman' çeşidi 3,58cm ile daha uzun bitkiler oluşturmuştur. Ortam*çeşit interaksiyonu

incelendiğinde en yüksek bitki boyunun CL-1-2’de 7,17 cm ile ‘Azman’ çeşidine ait olduğu görülmektedir. Ortam verilerine göre CL-1-2 ortamı 3,58 cm ortalama ile CL-1-3’ten (1,48 cm) daha başarılıdır.

Çalışmada kullanılan ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitlerinin olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarından somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen embriyolardan geliştirilen bitkilerde genetik açılımın olup olmadığı, SSR markır sistemine ait 12 SSR primeri kullanılarak tespit edilmiştir. SSR analizlerinde, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait giriş materyali olarak kullanılan bitkilerden ve somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerden alınan örnekler kullanılmıştır. Sonuç olarak, bu bitkilerle başlangıç materyali arasında genetik olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezimin belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamasında yardımcı olan, akademik alanda gelişimimde desteklerini esirgemeyen ve farklı bakış açıları kazandıran, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesine emek harcayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ ve Sayın Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK' e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince gerek laboratuvar gerekse çalışma dışında her türlü konuda yardımcı olan ve motive eden çok sevgili Zir. Yük. Müh. Melike CENGİZ' e, sonsuz teşekkür ederim.

Moleküler çalışmalarında yardımcı olan Dr. Dicle DÖNMEZ'e, Histolojik analizlerimde yardımcı olan Dr. Şenay Karabıyık ve Zir. Müh. Enes Yasin Şen'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam için bitkisel materyal sağlanması hususunda Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne, tezimin son aşamasında bitkilerimin uygun koşullarda yetiştirilmesi amacıyla seralarını açan YK Teknopark Ortak Girişimi ekibine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca çalışmalarında ve çalışma dışında her zaman yanımda olan sevgili Zir. Müh. Emrin PORTAKALÇİÇEĞİ'ne ve Biyoteknoloji Laboratuvar ekibine teşekkür ederim. Değerli arkadaşlarım Gizem OYMACI, Bahar ASLANTAŞ, Zir. Müh. Berfin DÜZGÖREN, Yük. Zir. Müh. İbrahim BEYATLI'ya bu süreçte yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü moral ve motivasyon için arkamda olan ilerlediğim bu yolda en büyük destekçilerim canım babam Kadir ÖZLEM ve canım annem Sadegül ÖZLEM başta olmak üzere değerli aileme ve kedimiz Mars'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGE VE KISALTMALAR	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. Muz Türlerine İlişkin Somatik Embriyogenesis Çalışmaları.....	13
2.2. Farklı Türlerle İlişkin Somatik Embriyogenesis Çalışmaları.....	19
2.3. Somatik Embriyogenesis ile İlgili Histolojik Çalışmalar	21
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	25
3.2. Metot.....	28
3.2.1. Bitkisel Materyalin Temin Edilmesi	28
3.2.2. Olgunlaşmamış Erkek ve Dişi Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu	31
3.2.3. Eksplantların Kültüre Alınması ve Kültür Koşulları.....	32
3.2.4. Olgunlaşmamış Erkek ve Dişi Çiçek Tomurcuklarının Kültüre Alınması Besin Ortamı.....	34
3.2.5. Kallus ve Somatik Embriyo Geliştirme Ortamı	37
3.2.6. Histolojik Analizler	39
3.2.6.1. Örneklerin Fiksasyon Solüsyonu ile Muamele Edilmesi.....	39
3.2.6.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçerisine Alınması	40

3.2.6.3. Örneklerin Hematoxylin Boya Çözeltilisi ile Boyanması	41
3.2.7. Farklılaşma ve Çimlenme	42
3.2.8. Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi.....	42
3.2.9. DNA İzolasyonu.....	42
3.2.10. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması	43
3.2.11. DNA İzolasyon Aşamaları	44
3.2.12. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi	45
3.2.13. SSR- PCR Koşulları	46
3.2.14. SSR Primerlerinin Belirlenmesi	48
3.2.15. Li-Cor için Poliakrilamide Jel Hazırlığı.....	49
3.2.16. Li-Cor Elektroforez Koşulları	50
3.2.17. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler.....	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1. BULGULAR.....	55
4.1.1. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Çeşitlerinde Somatik Embriyogenesis Bulguları.....	55
4.1.1.1 Yüzey Sterilizasyonuna Ait Bulgular	55
4.1.1.2. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Olgunlaşmamış Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcuklarına Ait Kallus Oluşturma Bulguları.....	55
4.1.1.3. ‘Azman’ Ve ‘Grand Naine’ Muz Çeşitlerine Ait Kallus Geliştirme ve Somatik Embriyo Bulguları	57
4.1.2. Somatik Embriyogenesis Yöntemi ile Elde Edilen Bitkilere Ait Bulgular	64
4.1.2.1 Kök Sayısına Ait Bulgular.....	70
4.1.2.2 Ortalama Kök Uzunluğuna Ait Bulgular.....	71
4.1.2.3. Dış Koşullardaki Bitkilerin Yaprak Sayısına Ait Bulgular ...	72
4.1.2.4. Bitki Boyuna Ait Bulgular.....	73
4.1.2.5. Yalancı Gövde Uzunluğuna Ait Bulgular	74

4.1.2.6. Yaprak Klorofil Miktarına Ait Bulgular.....	75
4.1.3. Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular	76
4.1.4. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Histolojik Analiz Bulguları	78
4.1.4.1. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Histolojik Bulgular.....	78
4.1.4.2 ‘Azman’ Çeşidine Ait Histolojik Bulgular	83
4.2. TARTIŞMA.....	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	105



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Ülkelere Ait Muz Üretim Miktarları	3
Çizelge 1.2.	Dünya Muz Üretim Miktarının Yıllara Dağılımı	3
Çizelge 1.3.	Yıllara Göre (2010-2020) Türkiye Muz Üretimi	5
Çizelge 1.4.	Türkiye’de İller’e Göre Muz Üretim Miktarları	6
Çizelge 3.1.	MS (Murashige and Skoog, 1962) Besin Ortamı İçeriği	36
Çizelge 3.2.	Kallus Geliştirme Ortamı.....	38
Çizelge 3.3.	Kallus Geliştirme Ortamı Deneme Planı	38
Çizelge 3.4.	Kallus Gelişimine Ait Gözlem Tablosu.....	39
Çizelge 3.5.	Johansen Karışımlarında Kullanılan Saf Su, Etil Alkol ve Tersiyer Bütil Alkol (TBA) Miktarları (ml)	40
Çizelge 3.6	DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Tampon Çözeltisinin İçeriği.....	43
Çizelge 3.7.	PCR Reaksiyon Koşullarının İçeriği.....	47
Çizelge 3.8.	SSR Analizlerinde Kullanılan Primerler.....	49
Çizelge 3.9.	Li-Cor Poliakrilamide Jel İçin Kullanılan Kimyasallar	50
Çizelge 4.1.	‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ Erkek Çiçek Eksplantlarının Kallus Geliştirme Ortamlarında Kalluslara Ait Gözlem Bulguları	59
Çizelge 4.2.	Deneme Desenindeki Ortamların Kallus Oluşturma Yüzdelerine Ait Veriler	61
Çizelge 4.3.	Kök Sayısına (Adet) Ait Veriler	71
Çizelge 4.4.	Kök Uzunluğuna (cm) Ait Veriler	72
Çizelge 4.5.	Yaprak Sayısına (Adet) Ait Veriler	73
Çizelge 4.6.	Bitki Boyuna (cm) Ait Veriler	74
Çizelge 4.7.	Yalancı Gövde Uzunluğuna (cm) Ait Veriler.....	75
Çizelge 4.8.	Klorofil Miktarına Ait Bulgular.....	76
Çizelge 4.9.	DNA Kalite ve Miktarlarına Ait Sonuçlar	77



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Dünya Muz Üretim Alanları.....	2
Şekil 1.2.	Muz Üretim Değerlerinin Kıtalara Göre %'lik Dağılımı).....	2
Şekil 1.3.	Türkiye Muz Üretim Alanları ve Değerleri.....	5
Şekil 3.1.	Grand Naine	26
Şekil 3.2.	Azman	27
Şekil 3.3.	'Azman'a ait Meyve ve Erkek Çiçeklerin Farklı Evreleri	27
Şekil 3.4.	'Azman' Bitkisine Ait Çiçeklenmenin Görünümü.....	28
Şekil 3.5.	Muz Bitkisi Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu.....	29
Şekil 3.6.	'Azman' ve 'Grand Naine' Çeşitlerine Ait Çiçeklenme ve Tomurcuk Oluşumu.....	30
Şekil 3.7.	Muz Bitkisi Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğu Belirleme Aşaması	30
Şekil 3.8.	'Grand Naine' ve 'Azman' Erkek Çiçek Tomurcuklarının Brakte Yapraklarından Ayrılması Aşaması.....	31
Şekil 3.9.	Sterilizasyon Aşamaları.....	32
Şekil 3.10.	Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğunun Kültüre Alınması.....	33
Şekil 3.11.	Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğunun Kültüre Alınması.....	34
Şekil 3.12.	Besin Ortamı Hazırlığı Aşamaları	35
Şekil 3.13.	DNA İzolasyonu İçin 'Azman' ve 'Grand Naine' Yapraklarının Sıvı Azotla Muamele Edilerek Havanda Ögütülmesi.....	43
Şekil 3.14.	DNA İzolasyonu Aşamaları	45
Şekil 3.15.	DNA Kalite ve Miktarının Spektrofotometre ile (Nanodrop ND 100) Ölçülmesi A. Nanodrop Cihazına Örneklerin Yüklenmesi B. DNA Kalitesi ve Miktarının Ölçülmesi	46
Şekil 3.16.	PCR Reaksiyonlarının Kurulması	47
Şekil 3.17.	PCR Reaksiyonları Döngü Programı.....	48
Şekil 3.18.	Poliakrilamid Jel Hazırlanması ve Li-Cor Elektroferez Cihazı.....	51

Şekil 4.1.	Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu Eksplantlarında Kallus Oluşumu.....	56
Şekil 4.2.	Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğu Eksplantlarında Curds (İsmi ile tanımlanan karnabaharimsi) Yapıların Oluşumu	57
Şekil 4.3.	‘Azman’ Erkek Çiçek Eksplantlarında Ortam Denemesinde 2. Haftadan İtibaren Gerçekleşen Kallus Gelişimi	60
Şekil 4.4.	‘Azman’ Erkek Çiçek Eksplantlarının BAP+Pikloram Konsantrasyon/ Kombinasyon Ortamlarında Kallus Gelişimi	60
Şekil 4.5.	Erkek Çiçek Eksplantlarına Ait Embriyojenik Kallus Görüntüleri	62
Şekil 4.6.	‘Grand Naine’ Çeşidinde 10. Hafta’nın Sonunda Meydana Gelen Yapılar	63
Şekil 4.7.	‘Grand Naine’ Çeşidinde 20. Hafta’nın Sonunda Meydana Gelen Yapılar	63
Şekil 4.8.	‘Azman’ Çeşidinde 16. Hafta Sonunda Meydana Gelen Yapılar.....	64
Şekil 4.9.	‘Grand Naine’ CL-1-3 (1.5 mg/l 2,4-D) MS Besin Ortamında Gelişen Kalluslardan 0,05 mg/l BAP + 1 mg/l Pikloram MS Besin Ortamında Elde Edilen Somatik Embriyoların 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA MS Besin Ortamında Geliştirildikten Sonra Hormonsuz MS Ortamında Çimlendirilmesine Ait Görüntüler	65
Şekil 4.10.	‘Azman’ Çeşidine Ait Eksplantlarda CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) Ortamında Gelişen Kalluslardan 0,05 mg/l BAP + 1 mg/l Pikloram İçeren MS Besin Ortamında Elde Edilen Somatik Embriyoların 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA İçeren MS Besin Ortamında Geliştirildikten Sonra Çimlendirilmesine Ait Görüntüler	66

Şekil 4.11. ‘Grand Naine’ Çeşidi, Hormonsuz MS Ortamında Gelişen Bitkiciklerin 4 Hafta Sonra 2. Altkültüre Alınması Sırasındaki Görüntüler	66
Şekil 4.12. ‘Azman’ Çeşidi, Hormonsuz MS Ortamında Gelişen Bitkiciklerin 4 Hafta Sonra 2. Altkültüre Alınması Öncesi Görüntüleri	67
Şekil 4.13. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Bitkiciklerin Hormonsuz MS Besin Ortamında 3.Altkültüre Alınması İşlemine Ait Görüntüler.....	67
Şekil 4.14. ‘Azman’ Çeşidine Ait Bitkiciklerin Hormonsuz MS Ortamında 3. Altkültüre Alınması İşlemine Ait Görüntüler.....	67
Şekil 4.15. ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ Bitkilerinin 3. Altkültür Sonunda Besin Ortamından Çıkarılmasına Ait Görseller.....	68
Şekil 4.16. Üç Altkültür Boyunca Hormonsuz MS Besin Ortamında Kök ve Sürgünleri Gelişen ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Bitkiciklerin Aklimatizasyon Öncesi Görüntüleri.....	68
Şekil 4.17. Üç Altkültür Boyunca Hormonsuz MS Besin Ortamında Kök ve Sürgünleri Gelişen ‘Azman’ Çeşidine Ait Bitkiciklerin Aklimatizasyon Öncesi Görüntüleri	69
Şekil 4.18. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Çeşidine Ait Bitkilerin Aklimatizasyon Sonrası Görüntüleri	69
Şekil 4.19. F.1. Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu	70
Şekil 4.20. 1-4 MA 1-17 No’lu Primer, 5-8 AGMI 93-94, 9-12 AGMI 103-103, 3-16 MAOCEN 03, 17-20 MAOCEN 12 No’lu Primerlere Ait Poliakrilamid Jel Görüntüsü.....	78
Şekil 4.21. A. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Örnekte Oluşan Farklı Safhalardaki Embrioların Birlikte Görünümü, B. Analiz İçin Verilen Örneğe Ait Fotoğraf	79

Şekil 4.22. A. Gelişmekte Olan Globular Embriyoların Işık Mikroskopundaki Görüntüsü, B. Gelişmekte Olan Embriyolara Ait Hücrelerdeki Yoğun Nişasta Birikimi	79
Şekil 4.23. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Örnekte Gelişmekte Olan İleri Safhadaki Embriyolar; A. Oblong, B. Yürek, C. Torpedo, D. Kotiledon.....	80
Şekil 4.24. Pro-Embriyoların Oluşumu.....	81
Şekil 4.25. Gelişmekte Olan Pro-Embriyolar. A. 32-64 Hücreli Bir Pro-Embriyo, B. Proembriyo Oluşumu Sırasındaki Hücre Bölünmeleri ve Nişasta Biriktirmiş Hücreler	81
Şekil 4.26. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Eksplantların 1.5 mg/l 2,4-D İçeren MS Besin Ortamında Gelişen Kalluslarının 0,05 Mg/l BAP ve 1.0 mg/l Pikloram İçeren MS Besin Ortamında Oluşturduğu Embriyolar ve Safhalarının Belirlenmesi Amacıyla Seçilmiş Örnek	82
Şekil 4.27. Gelişen Embriyolar. A. Globular Sonrası Oblong Safha, B. Kalp Safhası	82
Şekil 4.28. A. Kotiledon Safhası ile Kotiledon’un İleri Safhaları B. Uzamış Armut Şeklindeki Embriyolar	82
Şekil 4.29. A. İncelenen Örneğe Ait Görsel B. Gelişmekte Olan Embriyoda Başlayan Hücre Dejenerasyonu C. Hücrelerde Meydana Gelen Deformasyon	83
Şekil 4.30. Tez Çalışmasına Ait Aşamalarının Şematize Edilmiş Görünümü	89

SİMGE VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
2,4-D	: Dichlorophenoxyacetic acid
2IP	: 6-(g,g-dimethylallylamino)-purine
BAP	: 6-Benzylamino purine
CTAB	: Cetyltrimethylammoniumbromide
dk	: Dakika
DNA	: Deoxyribonucleic acid
FAO	: Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
g	: Gram
GA ₃	: Gibberallic acid IBA: Indolebutyric acid
IAA	: Indoleacetic acid
KİN	: 6-furfurylamino purine
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mm	: Milimolar
MS	: (Murashige ve Skoog, 1962)
NAA	: Naphtaleneacetic acid
ng	: Nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
rpm	: Revolution per minute
SH	: Schenk & Hildebrandt
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TDZ	: Thidiazuron

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu
μM : Mikromolar

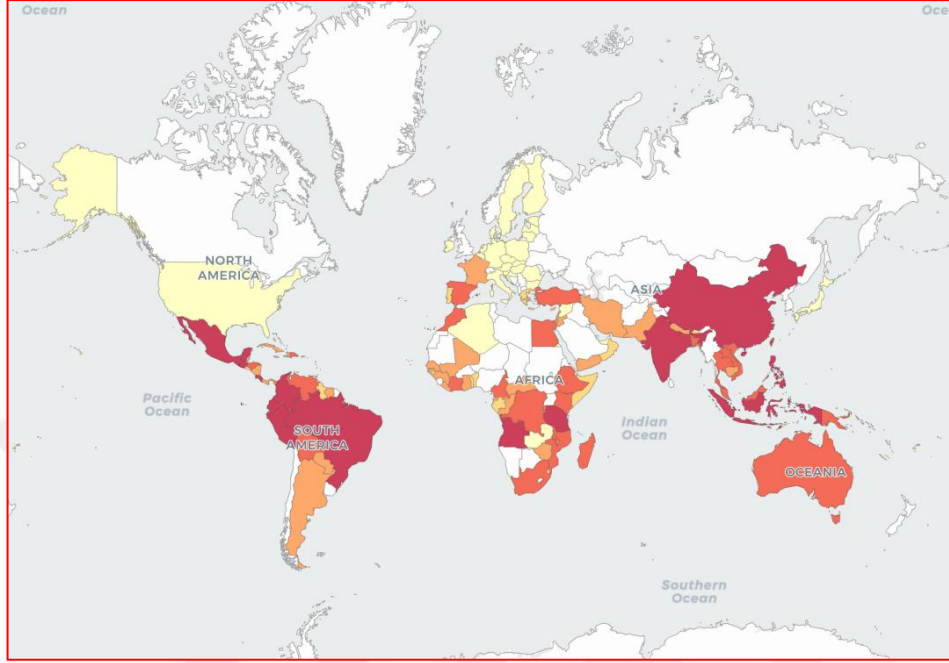


1. GİRİŞ

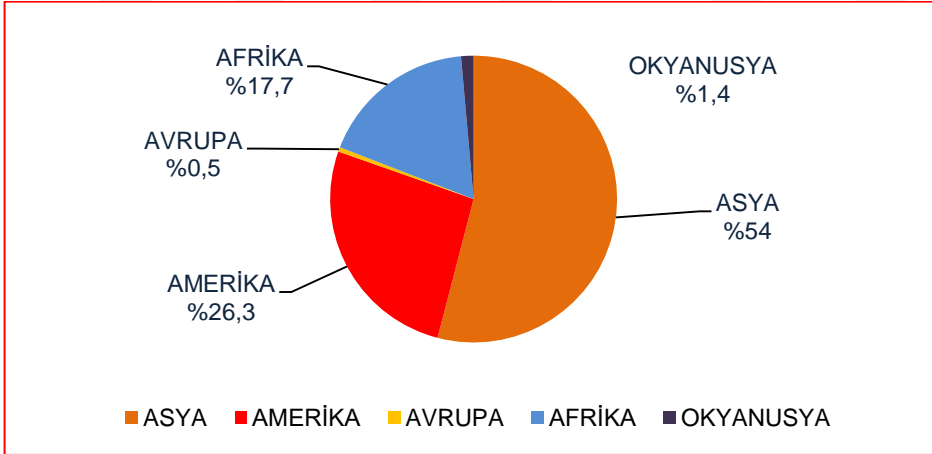
Muz (*Musa spp.*), *Zingiberales* takımının *Musaceae* familyasına ait bir bitki türüdür. Meyvelerini yediğimiz muz, *Musa* cinsine aittir. Dünya’da yaklaşık 150 ülkede ekonomik yetiştiriciliği yapılan, subtropik ve tropik iklim kuşağında yer alan, ticari değeri yüksek olan, önemli meyve gruplarından biridir (Marimuthu ve ark, 2019). Muz, tropik bölgelerdeki milyonlarca insanın temel besin gıdasıdır. Dünyada ekonomik hacmi yüksek olan ve ticari olarak yetiştirilen ürünlerden kahve, tahıl grubu, şeker ve kakaodan sonra 5. sıradadır. Önemli meyve gruplarından üzüm, elma ve turunçgiller arasındadır (Sarıdaş ve ark, 2017).

Muz ile ilgili bugüne kadar 40 tür ve 250 kadar çeşit belirlenmiştir. Dünya çapında yetiştirilen muz gruplarını %41 ile Cavendish, %24 ile pişirilerek yenilen muzlar, %14 Gross Michel, %21 plantain oluşturmaktadır (Faruk ve ark, 2021). Muz’un gen merkezi, Hindistan, Güney Çin ve Avustralya arasında kalan adalardır. 2021 yılı FAO verilerine göre en fazla muz üretimi yapan 10 ülke Hindistan, Çin, Endonezya, Brezilya, Ekvator, Filipinler, Guatemala, Angola, Birleşik Tanzania Cumhuriyeti ve Kolombiya’dır. Dünya muz üretiminde ilk sırada yer alan ülkelere ait üretim miktarları Çizelge 1.1’de verilmiştir (FAOSTAT, 2022). Muz dünya’da 119 milyon ton üretim hacmine sahiptir (FAOSTAT, 2022). Dünya muz üretiminin yıllara göre dağılımı Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Muz yetiştiriciliği tropik koşullarda; Brezilya, Hindistan, Ekvador, Filipinler, Honduras, Endonezya, Kolombiya ve Kosta Rika gibi ülkelerde, subtropik iklim koşullarında ise Mısır, Avustralya, Kanarya Adaları (İspanya), İsrail, Lübnan, Güney Afrika, Ürdün ve Türkiye gibi ülkelerde yapılmaktadır (Gübbük ve ark, 2003). Dünya muz üretim alanları Şekil 1.1, muz üretim değerlerinin kıtalara göre %’lik dağılımı ise Şekil 1.2’de verilmiştir (FAOSTAT, 2022).



Şekil 1.1. Dünya Muz Üretim Alanları (FAOSTAT, 2022)



Şekil 1.2. Muz Üretim Değerlerinin Kıtalaraya Göre %'lik Dağılımı (FAOSTAT, 2022)

Çizelge 1.1. Ünelere Ait Muz Üretim Miktarları (FAOSTAT, 2022)

Ülke	Üretim Miktarı (Ton)
Hindistan	31.504.000
Çin	11.872.600
Endonezya	8.182.756
Brezilya	6.637.308
Ekvator	6.023.390
Filipinler	5.955.311
Guatemala	4.476.680
Angola	4.115.028
Birleşik Tanzanya Cumhuriyeti	3.419.436
Kolombiya	2.434.900

Çizelge 1.2. Dünya Muz Üretiminin Yıllara Göre Dağılımı (FAO, 2022)

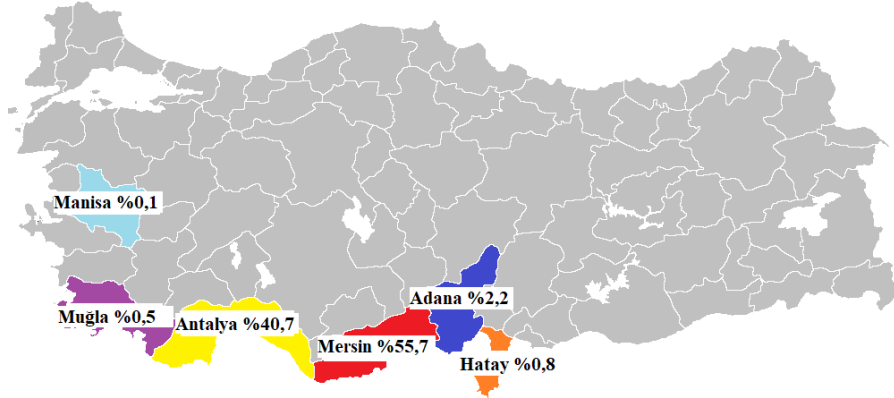
Yıllar	Dünya (Ton)
2010	108.977.923
2011	109.504.130
2012	109.772.225
2013	112.986.994
2014	112.353.105
2015	114.950.266
2016	112.112.614
2017	113.289.235
2018	116.653.973
2019	117.525.115
2020	119.833.677

18. yüzyılının ortalarında Mısır'dan Alanya'ya süs bitkisi olarak getirilmiş olan muz bitkisinin ticari yetiştiriciliğine, 1935 yılında Anamur'da başlamıştır (Pınar ve ark, 2007). Muz ülkemizde, 36° kuzey enlemlerinde yetiştirilmektedir. Muz yetiştiriciliği için uygun sıcaklık 27°C'dir ve sıcaklık 15°C'nin altına düştüğünde yetiştiricilik olumsuz etkilenmektedir (Espino ve ark, 1992). Anamur ve Bozyazı'da örtüaltı yetiştiricilik, 1980'li yıllarda başlamış olmasına rağmen 1990 yılından itibaren popüler olmaya başlamıştır (Sarıdaş ve ark, 2017).

Türkiye'de muz yetiştiriciliği yapan iller; Mersin, Antalya, Adana, Hatay, Muğla ve Manisa'dır. Mersin ve Antalya 405.214 ve 296.456 tonluk üretim ile en fazla muz üretim miktarına sahip illerdir (TÜİK, 2022). Türkiye'de muz üretim alanı 2019-2020 yılı sezonunda 85 bin dekar iken 2020-2021 sezonunda 111 bin dekara yükselmiştir. 2020 yılıyla birlikte üretim bölgeleri %55,7 ile Mersin, %40,7 ile Antalya'dır. Bu illerin yanı sıra %2,2 Adana, %0,8 Hatay, %0,5 Muğla ve %0,1 Manisa'da muz yetiştiriciliği yapılmaktadır (Şekil 1.3) (TÜİK, 2022). Muz üretimi 2021 yılında %21,3 oranında artarken, muz verimi ise %1,05 artışla 6.528 kg/da'a yükselmiştir (TÜİK, 2022). Türkiye'de son 10 yılın muz üretim tablosu Çizelge 1.3'te, muz üretiminin yapıldığı iller ve üretim miktarları ise Çizelge 1.4'te sunulmuştur.

Çizelge 1.3. Yıllara Göre (2010-2021) Türkiye Muz Üretimi (TÜİK, 2022)

Yıllar	Üretim (Ton)
2010	210.178
2011	206.501
2012	207.727
2013	215.427
2014	251.994
2015	270,500
2016	305.926
2017	369.909
2018	498.888
2019	548.323
2020	728.123
2021	883.455



Şekil 1.3. Türkiye Muz Üretim Alanları ve Değerleri (TÜİK,2022)

Çizelge 1.4. Türkiye’de İller’e Göre Muz Üretim Miktarları (TÜİK,2022)

İL	Üretim Miktarı (Ton)
Mersin	405.214
Antalya	296.456
Adana	16.192
Hatay	5.668
Muğla	3.663
Manisa	890

Muz meyvelerinin hem kabuk hem de meyve etinde, fenolik bileşik, karotenoid, biyojenik amin ve besin içeriği olmayan ama insan sağlığı için oldukça önemli olan fitokimyasallar başta olmak üzere birçok biyoaktif bileşikler içerdiği nedeniyle insan sağlığı ve tedavisi açısından, insan beslenmesinde çok büyük katkıları vardır (Singh ve ark, 2016; Sarıdaş ve ark, 2017). Sayılan bileşiklerin çoğunun antioksidan özellikte olmaları da muz meyvesinin insan beslenmesindeki önemini bir kez daha ortaya koyar niteliktedir.

Muz, *Musaceae* (Muzgiller) familyasının *Musa* cinsine bağlı çok yıllık rizomlu ve otsu bir bitkidir. Muzun rizomları gerçek gövdeyi oluşturur. Yenilebilir muzları sınıflandırmak için Simmonds ve Shepherd (1955) tarafından modern bir yöntem geliştirilmiştir. Modern yenilebilir muzların çoğu başlangıçta Güneydoğu Asya'ya özgü iki yabani, tohumlu tür olan *M. acuminata colla* (B genomu) ve *M. Balbisiana colla* (B genomu)'dan gelmiştir. Bu iki yabani tür vejetatif olarak ve tohumlarıyla çoğaltılmaktadır. Bu türler diploid yapıdadır ve $2n=2x=22$ kromozomludur (Roux ve ark, 2008). Ploidy bilgisi ile ilgili olarak, *eumusa* bölümüne ait yenilebilir muzlar 22, 33 veya 44 kromozoma sahiptir. Temel haploid sayısı 11'dir. Bu nedenle çeşitler diploid, triploid veya tetraploid olabilir. Muz çeşitlerine ait 200-300 klonun yarısından fazlası triploid ve geri kalanı çoğunlukla

diploid yapıdadır. Tetraploid klonlar çok nadirdir. Kültürü yapılan birçok muz klonu ve plantainler triploid olup, $2n=3x=33$ kromozom sayısına sahiptir. Triploid muz yetiştiriciliği diploidlerden 100 kat daha fazladır ve triploidler daha sert, daha güçlü ve büyümesi daha kolaydır. Morfolojik olarak, triploidler ve tetraploidler diploidlerden daha büyük ve daha sağlamdır. Ayrıca, yaprak kalınlığı ve hücre boyutu, artan ploidy seviyesi ile birlikte artmaktadır (Robinson ve Saúco, 2010).

Muzlarda Cavendish grubu üyesi olan klonlar genellikle AAA, Plantainler AAB ve birçok pişirilerek tüketilen muz klonları ise ABB genomuna sahiptir (Gübbük ve Pekmezci, 2001). Muzun, *Musa cavendishii* (Meyveleri pişirilmeden yenen bodur bitkileri içeren çeşitleri içine alan tür), *Musa sapientum* (Meyveleri pişirilmeden yenen yüksek boylu bitkileri içine alan tür), *Musa paradisiaca* (Meyveleri fazla nişastalı oldukları için ancak meyveleri pişirilerek yenen çeşitleri içeren tür) gibi türleri mevcuttur.

Muz bitkisinde yaprak 2 kısımdan (yaprak ayası ve yaprak sapı) oluşur. Yaprak sapları toprak yüzeyinden itibaren başlayan ve yaprak ayasına kadar olan kısımdır. Yaprak olarak adlandırdığımız kısım yaprak ayasıdır. Yaprak ayasının dik durmasını sağlayan damarlar kalındır ve ayanın ortasından geçmektedir. Muz bitkisinin toprak yüzeyinden itibaren oluşan yaprak saplarının birleşmesi sonucu yalancı gövde meydana gelir. Ayası oldukça geniş iri yaprakları vardır, rüzgâra karşı savunmasız olduğu koşullarda su kaybı ve yırtılma gibi harabiyetlere karşı hassas olduğu için daha çok sera sistemleri ile yetiştirilmeye uygun bir bitki türüdür. Muz bitkisine ait yapraklar yalancı gövde olarak adlandırılan kısmın merkezinden sarmal şekilde ve saat yönünün tersinde rulo benzeri bir yapıda oluşmaktadır (Barker ve Steward, 1962).

Her bir muz meyvesi ‘parmak’ olarak adlandırılır. Parmakların birleşerek oluşturduğu yapıya ‘tarak’ denilmektedir. Tarakların birleşmesi sonucu oluşan salkıma ise ‘muz hevengi’ adı verilir. Her bir tarak sayısı türlere ve çeşitlere göre değişim göstermektedir (Simmonds, 1953). Muz bitkisinde çiçek ve meyveler salkım şeklindedir. Muz salkımlarında 3 çeşit çiçek bulunduran trimonoik

bitkilerdir. Hem dişi çiçek hem erkek çiçek hem de hermafrodit çiçek bulundurur. Dişi çiçekler ilk açılan braktelerin hemen altındadır. Hermafrodit çiçekler dişi çiçeklerin hemen altında, yeterince gelişmemiş erkek ve dişi organları bulunan, iki eşeyli çiçekler halindedir ve dişi çiçeklerin bittiği yerden başlar. Erkek çiçekler salkımın en uç kısmında brakte yaprakların içinde bulunur ve bu brakteler genellikle açılmaz, meyve sapına bağlı kalırlar. Triploid muzların neredeyse tamamı kısırdır ve partenokarpi yoluyla tohumuz meyve geliştirir.

Muz bitkisi vejetatif yollarla çoğaltılır (Paydaş, 2011). Muzlar vejetatif olarak rizom ve rizom gövde üzerinden çıkan yavru bitkiler ile çoğaltılmaktadır. Ancak bu materyaller, mantarlar, nematodlar, virüsler ve böcekler gibi zararlıları barındırabilir. Hastalıklar genellikle vejetatif üreme yoluyla yayıldığından, doku kültürü yöntemleriyle büyük ölçekte hastaliksız bitki materyali oluşturmak önemlidir. Bu nedenle, muz plantasyonlarının kurulması için geleneksel yöntemlerle ve doku kültürü yöntemleriyle elde edilen bitkisel materyaller olmak üzere iki tip çoğaltma materyali kullanılır (Kaçar ve Faber, 2012).

Geleneksel yöntemler kullanılarak elde edilen çoğaltma materyali genellikle rizom ve gövde üzerinden çıkan yavru bitkilerdir (Robinson ve Galán, 2010; Escobedo ve ark, 2018). Fakat bu materyaller bazı patojenlerden ve nematodlarla enfekte olmakta ve farklı zamanlarda geliştikleri için homojen olmamaktadır. Dolayısıyla yetiştiriciliği sınırlamaktadır. Sonuç olarak, doğrudan organogenesis (DO) veya somatik embriyogenesis (SE) yoluyla elde edilen *in vitro* rejenere bitkiler, tropik bölgelerde muz ve muz materyallerinin yetiştirilmesi için tavsiye edilir, çünkü bunlar hastalıktan arı olabilir, kararlı büyüme gösterir ve daha verimlidir (Njuguna ve ark, 2011). Sterilite, poliploidi ve partenokarpik doğasına rağmen, geleneksel üreme yoluyla ticari muz çeşitlerinin ıslahı, embriyo kültürü ve embriyo kurtarma yoluyla mümkün olmuştur (Uma ve ark, 2009).

In vitro teknikler uzun ve zorlu ıslah süreçlerini kısaltmak ve sorunların üstesinden gelmek için önemli bir araçtır (Tangolar ve ark, 2008). Doku kültürü tekniği kullanılarak, doku veya hücrelerde değişimler olacak uygulamalarla sürgün

taslağı oluşumu ve somatik embriyogenesis olmak üzere iki şekilde bitki elde edilir. Bu yöntemler kullanılarak çoğaltılan bitkiler kısa sürede zararlı ve hastalıklardan arındırılmış olup, klasik yollar kullanılarak çoğaltılan bitkilere oranla daha hızlı olacak şekilde büyüme ve gelişme gösterirler (Arias, 1992; Gübbük ve ark, 2003). Farklı araştırmacılar tarafından doku kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar, meristem kültürü yöntemi kullanılarak çoğaltılan bitkilerde klasik yollar kullanılarak çoğaltılan bitkilere göre bitkinin büyüme ve gelişmesi, verimi ve önemli diğer kalite kriterleri konusunda daha çok avantaj sağladığını göstermiştir (Daniells ve Smith, 1994; Robinson ve ark, 1993; Gübbük ve ark, 2003).

Somatik embriyogenesis, uygun koşullar altında embriyojenik hücrelerin somatik hücrelerden üretildiği ve daha sonra bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişiklik yoluyla organize embriyoların elde edildiği biyolojik bir süreçtir (Quiroz-Figueroa ve ark, 2006). Somatik embriyogenesis, muz klonal çoğaltımı ve genetik kaynakların korunması için yararlı bir araçtır, ayrıca genetik mühendisliğine tabi tutulan bitkilerin yenilenmesi için oldukça başarılı bir sistemdir (Khalid ve Tan, 2016).

Somatik Embriyogenesis, *in vitro* çoğaltma tekniklerinden biridir ve haploid veya diploid yapıları somatik yapılardan bir dizi embriyojenik çalışmalarla birlikte embriyo elde edilmesi yöntemidir. Ticari önemi olan türlerin hızlı, bir örnek çoğaltımı, üretimi için önemli olan somatik embriyogenesis yöntemi sayesinde tek bir eksplant kullanımından sınırsız embriyo üretimi gerçekleştirilebilir olarak kabul edilmektedir. Anaç bitkiden alınan kısıtlı materyalle hazırlanan hücre süspansiyon teknikleri ile az işçilikle çok kısa sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkündür. Bu şekilde klasik yöntemlerle çoğaltılan bitkiler için rekabet ortamı sağlanmış olur (Erişen, 2005; William ve Maheswaran, 1986). Hücre süspansiyonu tekniği ise embriyo elde etme konusunda az iş gücü ile kısa zamanda daha başarılı sonuç vermektedir. Elde edilen embriyolar zigotik embriyolar gibi gelişim gösterirler ve somatik embriyo olarak adlandırılırlar. Zigotik embriyo ile

somaik embriyolar arasındaki fark embriyoların elde edilme tekniklerinden kaynaklanmaktadır. Döllenme yoluyla elde edilen zigotik embriyolar genetik açılım gösterirken, somatik embriyodan gelişen bitkiler birörnek yapı oluştururlar. Yani genetik olarak açılım göstermedikleri için klon oluşturmaktadırlar.

Somatik embriyogenesis başarısını etkileyen faktörler, kullanılan eksplantın çeşiti, kaynağı, tipi eksplantların kültüre alındığı besin ortamının içeriği, kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler ve düzeyleri olarak sayılabilir. Somatik embriyogenesis yönteminde eksplant olarak çiçek kısımları, anterler, polen ve endosperm dokularının kullanılmasının iyi bir başlangıç materyali olduğu bildirilmiştir (Pierik, 1987). Somatik embriyogenesis yönteminde bitkilerin değişik kısımları kullanılmasının yanı sıra, önemli bir eksplant kaynağı olarak zigotik kökenli olgunlaşmamış embriyolar da sayılabilir. Bunun nedeni ise zigotik embriyoların embriyojenik yapıları geliştirmeye yönelik genleri aktif hale getirdikleri olarak düşünülmektedir.

Somatik embriyoların gelişme süreci birçok faktöre bağlı olarak gerçekleşir. Bunlar, kallus safhası olmadan eksplant dokusunun hücre veya hücre gruplarından gelişim sağlanması (Direkt Embriyogenesis) ve ara bir kallus safhası oluşumunun ardından gelişim sağlanması (İndirekt Embriyogenesis) olmak üzere 2 şekildedir. Çoğunlukla tozlanma gerçekleştikten iki hafta sonra bitkilerden izole edilen zigotik embriyolarda fazla miktarda direkt somatik embriyogenesis elde edildiği gözlemlenmiştir. Eksplantların besin ortamı içerisinde oksin(2,4-D, IAA, NAA, Pikloram) miktarının fazla olması durumunda kalluslarda embriyojenik yapı oluşumu gözlenir ve üzerinde pro-embriyo yapılar oluşur. Kalluslar, oksin grubu içermeyen besin ortamına ihtiva edildiğinde plumula ve radikula meristemleri aynı anda gelişen sürgün eksenini (bipolar yapılı) embriyolar geliştirir ve bitkiler bu yapılardan gelişir bu yöntem indirekt somatik embriyogenesis olarak tanımlanır. Tek bir hücreden veya hücre gruplarından Pro-embriyolar gelişir (Dalkılıç, 2013).

Somatik embriyo çalışmalarında en büyük avantaj, döllenme sonucu elde edilen bitkilerde gerçekleşen genetik açılımların olmamasıdır. Eksplantın alındığı

bitkiler somatik hücrelerden geliştikleri için, genotip özelliklerini bünyelerinde muhafaza ederek klon bitkiler oluştururlar. Klonal çoğaltım bitkilerde birörneklik sağlaması nedeniyle ticari yetiştiricilikte tercih edilmektedir.

Somatik embriyogenesis sentetik tohum üretiminde de kullanılan bir tekniktir ve elde edilen ürün embriyo olduğu için tohumlarda bulunan embriyoyla benzerdir. Sonuçta gerçek ve tam bir bitki elde edilir. Bu nedenlerden dolayı, tohum olarak kullanılmak istenilen embriyolar sentetik yollarla kaplanarak değerlendirilebilir. Somatik embriyoların kaplanmasıyla elde edilen sentetik tohumlarda zigotik embriyolarda olduğu gibi genetik açılım, görülmediği için klonal olarak çoğaltımı destekler niteliktedir. Çimlenme sırasında zigotik embriyolarda olan ama somatik embriyolarda olmayan en önemli fark ise besin kaynağı olarak kullanılan endosperm, depo kotiledonları ve tohum kabuğuna somatik embriyoların sahip olmamasıdır (Özcan ve ark, 2001; Dalkılıç, 2013).

Doku kültürü, ekonomik açıdan önemli bitkilerin üretimi için önemli bir potansiyel sunmaktadır. Yoğun kullanımına rağmen, muz çeşitlerinin *in vitro* kültürü için sürgün uçlarının kullanılması genellikle ciddi genetik varyasyona neden olur (Hwang ve Ko, 1987; Stover, 1987). Bu genetik varyasyon, somaklonal varyasyon (Larkin ve Scowcroft, 1981) olarak adlandırılır ve çok sayıda tip dışı oluşum veya somaklonal varyasyon ile sonuçlanır.

Muz ve plantain muzlarda embriyojenik kallusları indüklemek ve bitkileri yenilemek için çeşitli eksplant türleri kullanılmıştır. Bunlar arasında zigotik embriyolar (Cronauer-Mitra ve Krikorian, 1988; Escalant ve Teisson, 1989; Marroquin ve ark, 1993; Navarro ve ark, 1997) bazal yaprak kılıfları ve rizom dokusu, direkt erkek ve dişi çiçeklerden veya indirekt olarak sürgün ucu meristemlerinin, scalp ve erkek tomurcuklarının çoğaltılmasından sonra oluşan dokulardır. Olgunlaşmamış erkek çiçekler, Cavendish muzunun embriyojenik kültürlerini başlatmak için en uygun başlangıç materyali olarak görünmektedir (Escalant ve ark, 1994; Côteô ve ark, 1996; Navarro ve ark, 1997; Domergue ve ark, 2000; Becker ve ark, 2000). Sekonder embriyogenesisin yanı sıra, muz

protoplastlarından doğrudan somatik embriyogenesis bildirilmiştir. (Escobedo-GraciaMedrano ve ark, 2016). Birçok araştırmacı etli soğanlı yapıdan oluşan, karnabahara benzer yapıların embriyogenesis ve embriyojenik hücre süspansiyonları için iyi bir kaynak olduğu ve çoğalma yeteneği oldukça fazla olduğunu bildirmiştir (Dhed'a ve ark, 1991; Strosse ve ark, 2004).

Doku kültürü ile üretilmiş muzlarda varyasyon sıklığı göz önüne alındığında, muz bitkilerinin genetik stabilitesi hakkında bilgi edinmek oldukça önemlidir (Morais-Lino ve ark, 2016). Bu nedenle muzun *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında SSR markır sistemi somaklonal varyasyonun tespiti için farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Guimarães ve ark, 2009; Morais-Lino ve ark, 2016). SSR markırları 1-4 bant arasında tekrar eden nükleotid motifleri içerirler, bu bölgeler “mikrosatellit” olarak isimlendirilir ve PCR reaksiyonlarında bireysel olarak amplifiye olurlar. Kodominant, nispeten kolay, güvenilir, yüksek polimorfizm oranına sahip ve maliyeti düşük olarak kullanılan markırlardır (Aka Kaçar ve ark, 2007).

Bu tez çalışmasında, sürgün ucu yöntemi ile klonal çoğaltmada eksplant bulma zorlukları ve kontaminasyon riskinin yüksek olması dolayısı ile ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ muz çeşitlerinde, farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler kullanılarak somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Altkültürler boyunca oluşan kalluslarda ve somatik embriyogenesis aracılığı ile elde edilen bitkilerde önemli parametrelere bakılarak en iyi embriyo elde etme ve bitkiye dönüşüm protokolünün optimize edilmesi hedeflenmiştir. Başlangıç materyalleri ile somatik embriyolardan elde edilen bitkilerde genetik kararlılığının belirlenmesi için SSR markır sisteminin ile DNA analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Muz Türlerine İlişkin Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Jalil ve ark (2003), *Musa acuminata*'nın olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarından embriyojenik kallus oluşturmayı hedeflemişlerdir. Kültüre alınan 750 olgunlaşmamış erkek çiçek salkımından 5-6 ay sonunda %21,75 oranında embriyojenik kallus elde etmişlerdir. Embriyojenik kallus elde etmek amacıyla 4-11 pozisyonunda bulunan erkek çiçek kümelerini başarılı bulmuşlar ve çiçek kümesi başına 3-10 somatik embriyo oluştuğu gözlemlemişlerdir.

Youssef ve ark (2010), *Musa acuminata* (Cavendish, AAA), genotiplerinden 'Williams' ve 'Grand Naine' çeşitlerinde 1 ve 2 haftalık olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarında embriyojenik kapasiteleri üzerine araştırma yapmışlardır. Kallus giriş ortamı için MS+Vitamin, 5,71 µM IAA, 18 µM 2, 4-D, 5,4 µM NAA, 4,1 µM biotin, 87 mM sükröz kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı için ½ MS + Vitamin, 4,5 µM 2, 4-D, 200 mg/l KH₂PO₄, 174 mM sükröz, 2 g/l gelrite kullanmışlardır. 4 aylık bir indüksiyon sonucunda oluşan toplam kallus yüzdesi, iki haftalık 'Williams' tomurcuklarının eksplantlarında %97,81 ve iki haftalık 'Grand Naine' tomurcuklarının eksplantlarında %52,11 olarak belirlemişlerdir. Embriyojenik kallus oluşumunda, iki haftalık 'Williams' eksplantlarında %10,01 ile bir haftalık eksplantlardan (%0,78) daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. 'Grand Naine' çeşitlerinde ise bir haftalık tomurcukların eksplantlarında üretilen %7,51 embriyojenik kallus ile iki haftalık tomurcukların %2,49 embriyojenik kallus miktarının daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen embriyoların %15-35'inde bitki dönüştürme kapasitesinin yüksek (%99) olduğunu saptamışlardır.

Dai ve ark (2010), Da Jiao (*Musa paradisiaca*) ABB Linn. muzlarında olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanılarak indirekt somatik embriyogenesis, embriyojenik hücre süspansiyonu ve protoplast kültürü ile bitki rejenerasyonu üzerinde araştırma yürütmüşlerdir. Kallus giriş ortamı için MS, 4,1

μM biotin, 5,7 μM IAA, 5,4 μM NAA, 18 μM 2,4-D, 30 g/l sükröz, 7 g/l agar kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı için, MS, 4,1 μM biotin, 5,7 μM IAA, 5,4 μM NAA, 9 μM 2,4-D, 30 g/l sükröz, 7 g/l agar kullanmışlardır. Embriyojenik kallus oluşturma kapasitesini %5,79, bitki rejenerasyonunu ise %23 olarak saptamışlardır.

Meenakshi ve ark (2011), 'Lal Kela'(AAA) muz çeşidinin olgunlaşmamış erkek çiçeklerinde somatik embriyogenesis kapasitesi ve elde edilen rejenera bitkilerin moleküler analizi üzerine çalışma yapmışlardır. Kallus giriş ortamı için, MS, 18,10 μM 2,4-D, 5,71 μM IAA, 5,37 μM NAA, 1 mg/l d- biotin, %3 sükröz ve %0,2 gelrite kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamında MS, 4,52 μM 2,4-D, 1 mg/l biotin, 100 mg/l malt ekstrakt, 100 mg/l glutamine, %4,5 sükröz ve %0,2 gelrite kullanmışlardır. Oluşan embriyoların büyüme ve gelişmesi için MS+Vitamin, glutamine (100 mg/l), malt ekstrakt (100 mg/l), pikloram (1 mg/l), %4,5 sükröz ve %0,2 gelrite ortamı kullanmışlardır. Somatik embriyoların gelişmesi için 1/2 MS, 100 mg/l malt ekstrakt, %0,1 aktif karbon, %2 gelrite uygun bulunmuştur. BAP'ın somatik embriyo gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmış bunun için 0,02-20 mg/l konsantrasyon denemeleri yapılmış ve 0,5 BAP olan ortamda %50 çoğalma, %44 köklenme gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Uma ve ark (2012), *Musa acuminata* ssp. *Burmannica*'nın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış zigotik embriyolarında somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu üzerine araştırma yapmışlardır. Kallus giriş ortamı için MS+MW, 30 g/l sükröz, 2 g/l phytagel 4,5 μM 2,4-D kullanmışlardır. Kallus çoğaltmak ve bitki rejenerasyonu için kurulmuş MS, Morel vitaminleri, sükröz (30 g/l), phytagel (2 g/l) ve BAP, 2,4-D, pikloram, IAA konsantrasyon denemesi çalışmasında her 3 haftada bir altkültür yapmışlardır. Olgunlaşmamış zigotik embriyoda; %54 embriyojenik kallus, kallus oluşum başarısı sırayla; 2,4-D 4,5 μM (%93), 2,4-D 2,2 μM (%85,9) ve pikloram 4,1 μM (%84) elde edilmiştir. Olgunlaşmış zigotik embriyo; 0,8 μM pikloram (%54), BAP 2,2 μM +IAA 5,8 μM (%51) embriyojenik kallus elde etmişlerdir. En yüksek çoğalma yüzdesini 2,4-D ile desteklenmiş

ortamda gözlemlenmiştir.

Ali ve ark (2013), 'Grand Naine' çeşidinde olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanarak somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerinde araştırma yapmışlardır. Kallus giriş ortamı için, MS, 2,4-D konsantrasyonları (0,5, 1,0, 2,0 ve 4,0 mg/l) ve BAP (1,25, 2,5 ve 5,0 mg/l) konsantrasyonlarında, 8 haftalık inkübasyondan sonra MS ortamında erkek çiçek eksplantlarının embriyojenik kalluslardan rejenerasyonuna edilebilir muz bitkilerinin büyüme parametreleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1,0 mg/l) kullanılan 2,4-D'nin embriyojenik kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlenmiştir. Daha yüksek 2,4-D konsantrasyonu (2,0-4,0 mg/l), daha düşük konsantrasyonda kallusun nispeten kompakt olduğu ve kırılabilir bir kıvamına neden olduğunu belirtmişlerdir. Bitki olgunlaşması için oksinlerin gerekli olduğunu saptamışlardır.

Kulkarni ve ark (2013), nesli tükenmekte olan bir muz çeşidi olan Rajeli'nin (AAB) olgunlaşmamış erkek çiçek primordiumları kullanılarak hücre süspansiyon kültürlerinden somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine araştırma yapmışlardır. Kallus giriş ortamı için, MS + 4 µM 2,4-D + 1µM IAA + 1µM NAA + 1,0 mg/l D-Biotin, %3 sükröz, %0,2 gelrite, kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı için, MS+1µM, 2,4-D+1mg/l, D-Biotin+100 mg/l malt ekstrakt, 100µM Glutamine, %4,5 sükröz %0,2 gelrite kullanmışlardır. Embriyoların büyümesi ve gelişmesi için, SH+MS+Vitamin, 1mg/l Pikloram+100 mg/l Glutamine+100 mg/l malt ekstrakt, %4,5 sükröz, %0,2 gelrite kullanılmıştır. Çalışmalarında, %52-54 0,8 µM BAP konsantrasyonda maksimum çimlenme elde etmişlerdir. Torpedo evresindeki somatik embriyoların yaklaşık %40'ı uzun sürgünler ve iyi bir kök sistemi olan bitkilere dönüştüğünü gözlemlenmiştir. Embriyojenik kallus indüklemek için daha yüksek 2,4-D seviyesine ihtiyaç duyulmasına rağmen, uzun süreli maruz kalmanın embriyojenik yapı oluşturma potansiyelini azalttığını belirlemişlerdir.

Remakanthan ve ark (2014), *Musa acuminata* AAA cv. 'Grand Naine' çeşitlerinde yan sürgünleri kullanarak indirekt somatik embriyogenesis ve

embriyojenik hücre süspansiyonunda eksplant ve kültür koşullarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında giriş ortamı için MS, 13,31 µM BAP, 30 g/l sükröz ve 7 g/l agar kullanmışlardır. Kallus giriş ortamı için MS, 30 g/l sükröz ve 7 g/l agar ve 0,45–18,1 µM 2,4-D konsantrasyonları; 0–8,28 µM pikloram konsantrasyonları ve pikloram 0–8,28 µM + BAP 0,22–4,44 µM kombinasyonu denemesi yapmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı için MS, 30 g/l sükröz, pikloram ve BAP kombinasyonları denemesi (4,14 µM pikloram + 0,22 µM BAP, 2,07 µM pikloram + 0,22 µM BAP, 2,68 µM NAA + 0,89 µM BAP, 0,44–2,22 µM BAP), jel yapıcı madde konsantrasyonları denemesi (8, 10, 12 ve 14 g/l agar ya da 2, 4 ve 6 g/l phytigel) yapmışlardır. Test edilen 36 farklı ortamda pikloram ve BAP kombinasyonundan sadece 19 kombinasyon embriyojenik bir yanıtla sonuçlandığını belirtmişlerdir. En iyi yanıt (347 embriyo/eksplant) 4,14 µM pikloram ve 0,22 µM BAP ile desteklenmiş MS kullanılarak elde edilmiştir. 2,4-D konsantrasyon denemesinde embriyo oluşturmada maksimum başarı 0,9 µM olarak gözlemlenmişler ve konsantrasyon arttıkça embriyo oluşumunda azalma olduğunu belirtmişlerdir. Pikloram, tek başına kullanıldığında, somatik embriyogenesis teşvik ettiği ve daha büyük boyutlu embriyoların oluşumunu sağladığı tespit etmişlerdir. Ancak oluşan embriyoların kalitesi, BAP ile desteklendiğinde daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Morais-Lino ve ark (2016), 'Grand Naine' (AAA) ve Tropical (AAB) çeşitlerinin olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarını kullanarak indirekt somatik embriyogenesis, hücre süspansiyonu ve bu çeşitlerin genetik stabilitesi üzerine moleküler çalışmalar yürütmüşlerdir. Kallus giriş ortamı için, MS+Vitamin, 1 mg/l IAA, 4 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve glutamine konsantrasyonları (0, 50, 100, 150 ve 200 mg/l), 30 g/l sükröz, 7 g/l agaroz kullanmışlardır. Oluşan embriyoların büyümesi ve gelişmesi için, MS+Vitamin, 30 g/l sükröz, 7 g/l agar ve 5 farklı BAP ve IAA, (Kontrol, 0,2+0,1 mg/l, 0,4+0,3 mg/l, 0,6 +0,5 mg/l ve 0,8+ 0,7 mg/l) konsantrasyon denemeleri yapmışlardır. Rejenere bitkiyi en fazla 0,8 mg/l BAP ve 0,7 mg/l IAA içeren ortamda elde etmişlerdir. Bu çalışmada, embriyogenesis

indüklemek için sadece otoklavlanmış glutamin kullanılmış ve ‘Tropical’ için 200 mg/l glutamine’nin somatik embriyogenesis indüksiyonu için gerekli olduğunu saptamışlardır. Somatik embriyoların oluşumu, ‘Grand Naine’ çeşidinde glutamin yokluğunda meydana gelmiştir (Assani ve ark, 2001; Ramanathan ve ark, 2014). Embriyoların bitkilere dönüşme sıklığı, ‘Grand Naine’ ile maksimum %20,21 ve ‘Tropical’ %55,52-%79,72 ile net şekilde genotipik farklılık gözlemlemişlerdir. Genetik stabilite için SSR markır sistemi kullanılmış ve herhangi bir somaklonal varyasyon gözlemlememişlerdir.

Nandhakumar ve ark (2018), ‘Grand Naine’ (Musa AAA, Cavendish-sub group) ve Rasthali (Musa AAB, Silk-sub group) genotiplerinde olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanarak indirekt somatik embriyogenesis ve embriyojenik hücre süspansiyonu çalışmışlardır. Çalışmada, kallus giriş ortamı için MS besin ortamı, 30 g/l sükröz, 1 mg/l maltoz, 1 mg/l biotin, 1 mg/l 1 IAA, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 50 mg/l melatonin, 100 mg/l glutamine, 4 g/l agar kullanmışlardır. Somatik embriyoların büyüme ve gelişmesi için MS besin ortamı ve 2,4-D (0, 2, 4, 6, 10 mg/l), BAP (0, 0,5, 1, 1,5 mg/l), Askorbate (0, 10 mg/l), Zeatin (0, 0,5 mg/l), Sükröz-Maltoz (20:20 mg/l) konsantrasyon/kombinasyonlarını denemişlerdir. Somatik embriyoların büyüme ve gelişmesi için MS + 10 mg/l 2,4-D + 10 mg/l Askorbate + 0,5 mg/l Zeatin + 20:20 mg/l Sükröz-Maltoz) ortamında başarı elde etmişler; globular safha %37, kalp safha %29, torpedo %22-25 olarak saptanmış ve ayrıca farklı aminoasitlerin etkisi araştırılmış, en iyi tepkiyi glutamine 400 mg/l konsantrasyonunda tespit etmişlerdir. Genetik stabilite için ISSR markır sistemi kullanılmışlar ve herhangi bir genetik farklılık gözlemlememişlerdir.

Escobedo ve ark (2018), False Horn Plantain (AAB, cv. Curraré) ‘de dişi çiçek ve erkek çiçek tomurcukları kullanarak indirekt somatik embriyogenesis ve embriyojenik hücre süspansiyonu çalışmışlardır. Çalışmalarında, giriş ortamı için MS+Vitamin, 87 mM sükröz ve 1,0 µM IAA ve 2,5 µM TDZ kullanmışlardır. Kallus giriş ortamı için, MS+Vitamin, 4,1 µM biotin, 18,1 µM 2,4-D, 5,7 µM IAA, 5,4 µM NAA, 87 mM sükröz, %0,2 gelrite kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı

için, MS+1/2 Vitamin, 4,52 µM 2,4-D, 87 mM sükröz, %0,2 gelrite kullanmışlardır. Somatik embriyoların büyüme ve gelişmesi için, MS+Vitamin, 1,25 mM KH₂PO₄, %0,2 gelrite kullanmışlardır. Bu çalışmada, ikincil proliferatif dişi tomurcukların somatik embriyogenesis için %52 oranda daha iyi başarı sağladığı ve embriyojenik kültür için uygun bir seçim olduğu belirlenmiştir.

Natarajan ve ark (2020), *Musa laterita*, *Musa beccarii* ve *Musa velutina* süs muzlarında olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanılarak indirekt somatik embriyogenesis ve genetik stabilite üzerine çalışmışlardır. Kallus giriş ortamı için, MS, 4,1 µM biotin, 175,3 mM sükröz, 5 mM asparajin, 684 mM glutamine, 1,1 µM NAA, 1,1 µM IAA, 181 mM 2,4-D, %0,5 aktif karbon, %0,25 agar kullanmışlardır. Kallus çoğaltma ortamı için, MS, 4,1 µM biotin, 90,5 µM 2,4-D, 87,6 mM (%3) sükröz, 100 ml/l Hindistan cevizi suyu, 0,5 µM kinetin, %0,5 aktif karbon, %0,25 agar kullanmışlardır. Embriyoların büyüme ve gelişmesi için, SH basal, MS vitamins, 4,1 µM biotin, 175,3 mM (%6 w/v) maltoz, 5 µM BAP, 0,7 µM N⁶-(2-isopentenyl) adenine, %0,5 aktif karbon, %0,25 agar kullanmışlardır. Somatik embriyo indüksiyon sıklığının, inokülasyondan 120 ve 150 gün sonra analiz edildiğinde test edilen muzlara göre değiştiği bulmuşlardır. 120 gün sonra sırasıyla *M. beccarii* %33,33 ve *M. velutina* %32,37 indüksiyon frekansları ile eşit perforans gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Buna karşılık, *M. laterita* %17,25'lik zayıf bir indüksiyon frekansı sergilemiştir. Ancak, inokülasyondan 150 gün sonra indüksiyon sıklığı hesaplandığında, *M. beccarii* %57,24 indüksiyon ile %46,59 ile *M. velutina* ve %39,76 ile *M. laterita* ile karşılaştırmışlardır ve en iyisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Genetik stabilite için SRAP markır sistemi kullanılmış ve herhangi bir somaklonal varyasyon gözlemlenmemiştir.

2.2. Farklı Türlerle İlişkin Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Tangolar ve ark (2007), 41 B Amerikan asma anacı (*V. vinifera* L. cv. 'Chasselas' x *V. berlandieri*) ve Yalova incisi üzümünün (*V. vinifera* L.) anterlerini kullanarak embriyogenik kallus elde etmek amacıyla MS, NN ve B5 ortamlarında, farklı 2,4-D (0, 0,5, 1, 2 ve 4 mg/l) ve BAP (0, 0.1, 0.2, 1 ve 2 mg/l) kombinasyonlarını kullanarak, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve sürekli karanlık olacak şekilde kültüre alınmıştır. Sonuç olarak yalnızca 2,4-D konsantrasyonları içeren besin ortamlarında kallus elde edememişlerdir. 41B Amerikan asma anaçlarına ait anterlerde kallus oluşumu için en uygun ortamın 2,4-D + BAP kombinasyonlarının 1 mg/l + 0.2 mg/l (%70) ve 2 mg/l + 1 mg/l (%73.1) içeren B5 besin ortamında karanlık kültür koşullarında olduğunu saptamışlardır. Yalova incisinde kallus oluşumunun %4,17'sinde 4 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l BAP içeren B5 ortamında %1,52'sinin ise 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren NN ortamındaki anterlerde tespit etmişlerdir.

Biçen ve ark (2008), On farklı turungil genotipinde stil ve ovül kültürü kullanılarak kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu ile ilgili çalışmışlardır. Eksplantları birinci yıl 500 mg/l Malt Ekstrakt ile 1.0 mg/l 2,4-D, 3 farklı BAP(0, 0,5, 1,0 mg/l) eklenmiş MS ve MT vitaminleri içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. İkinci yıl stillere ait eksplantlar, MS-basal ortamı, ME ile BAP (1,0, 2,0, 3,0 mg/l) konsantrasyonları içeren ortamda kültüre almışlardır. İkinci yıl denemelerinde ovül eksplantları için hormon içermeyen MS macro ve micro, MT vitaminleri ile ME ortamlarında kültüre almışlar, ayrıca 2,4-D (1,0 mg/l) ve 3 farklı BAP (0, 0,5, 1,0 mg/l) konsantrasyonu içeren ortamlar kullanmışlardır. Stil ve ovül eksplantlarının somatik embriyo eldesinde genotiplerin aynı tepkileri vermediklerini tespit etmişlerdir. Stil eksplantlarından somatik embriyo oluşumu %0 (AREC Swingle Sitrumelo, M2 Sitranjı, Volkameriana, Pomeroy üç yapraklısı) ve %100 (Gou Tou turuncu) iken ovül eksplantlarında somatik embriyo oluşum oranları %0 (Carrizo Sitranjı, Alanya Dilimli Portakalı, AREC Swingle Sitrumelo) ile %100 (Tuzcu 891 ve Kleopatra

Mandarini) olarak saptamışlardır.

Temiz ve ark (2009), Nar (*Punica granatum*)’da Hicaz ve Silifke Aşısı çeşitlerinin, yaprak, hipokotil, kotiledon ve kök eksplantlarını, 2,4-D ve BAP kombinasyonlarının somatik embriyo oluşumundaki rolünü ve Spermin (poliamin türevi) konsantrasyonlarının, eksplantlarda rejenerasyonu yeteneği üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları çeşitlerden Silifke Aşısında %36,60 beyaz kallus ile daha iyi sonuç elde etmişlerdir. Nar çeşitlerinin embriyo oluşturmada istatistiki olarak etkili olmadığını bulmuşlardır. Çalışmada yer alan eksplant tiplerindeki başarıyı sırasıyla, %10.01 kotiledon, %9,78 hipokotil, %8,53 kök ve %7,53 yaprak, olarak tespit etmişlerdir.

Sezgin ve ark (2009), çalışmalarında *Castanea sativa Mill.* Osmanoğlu ve Sariaşlama çeşitlerinde serbest tozlanma yoluyla elde edilen olgunlaşmamış tohumların kotiledonlarında somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonunu incelemişlerdir. Kotiledon eksplantlarında MS, DKW ve WPM ortamlarını, organik maddeler (L-glutamin (250 mg/l) veya kazein hidrolizat (1000 mg/l)), AgNO₃ (0 ve 1.7 mg/l), katılaştırıcı ve 7 farklı büyüme düzenleyici madde kombinasyonu denemişlerdir. Osmanoğlu çeşidinde en yüksek somatik embriyogenesis değerleri %4.7-9,7 olarak saptanmıştır. Sariaşlama çeşidinde ise %12 ve %11,2 olarak saptamışlardır. WPM ortamlarında somatik embriyo elde edememişlerdir.

Dalkılıç ve ark (2013), Sarılop incir çeşidinin yaprak segmentlerinin direkt ve indirekt somatik embriyogenesisi üzerinde çalışmışlardır. Eksplantları Kasım ve Mart aylarında MS besin ortamında kültüre almışlardır. Kallus oluşumunu %66.66 2 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l KIN içeren ortamda elde etmişler fakat somatik embriyo elde edilmediğini rapor etmişlerdir. Direkt somatik embriyo eldesi çalışmalarında yaprak eksplantlarını TDZ ve 2İP içeren MS ortamlarında kültüre almışlar ve embriyo oluşumu gözlemişlerdir. İlkbahar döneminde MS + 2 mg/l TDZ + 8 mg/l 2İP içeren ortamda %42.76 kök oluşum oranı ve %20 embriyo oluşum oranı elde etmişlerdir. Eksplant başına 0.83 somatik embriyo oluşumu tespit etmişlerdir. 2

mg/l TDZ + 4 mg/l 2İP içeren MS ortamında %83 oranında kallus gelişmesi gözlemlenmiştir.

2.3. Somatik Embriyogenesis ile İlgili Histolojik Çalışmalar

Triploid *Musa cv.* 'Grand Naine'nin rizom eksplantlarından elde edilen somatik embriyoların kökeni, ontogenetik gelişimin farklı aşamaları süresince histolojik çalışmalarının konusu olmuştur.

Lee ve ark (1996), araştırmalarında, somatik embriyoların çoğunluğunun normal kök oluşumu gösterdiğini ve zayıf yapılı sürgün ucu oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Embriyojenik kütle ve somatik embriyolar çoğunlukla morfolojik olarak yetkin birkaç hücreden oluşmuştur. Küresel embriyoların geç evreleri küçük hücreli, yüksek oranda sitoplazma içeren epidermal hücrelerden oluştuğunu gözlemlenmiştir. Bazı embriyoların beyaz renkli bir hipokotil ile yeşil renkli bir plumulaya sahip olduğu, yüksek oranda vakuolasyonlu hücrelerden oluşan bir kök ve sadece kök geliştiren embriyolar geliştirdiğini belirtmişlerdir. Olgunlaşmış embriyonun bir bölümünde, hipokotilden köke kadar vasküler ipliklerle bağlantılı bir kotiledon yarığı olduğunu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bu somatik embriyolardan bitki rejenerasyonu gözlemlenmemiştir.

Jalil ve ark (2008), araştırmalarında morfolojik ve histolojik çalışmalar ile somatik embriyogenesisin aşamalarını incelemişlerdir. Histolojik analizler ile embriyojenik ve embriyojenik olmayan kallus arasındaki farkı araştırmışlardır. *Musa acumunata*'nın somatik embriyogenesisi sırasında, somatik embriyo oluşumların başlatılmasından başlayarak hücre süspansiyonunun oluşturulmasına ve ardından somatik embriyoların bitkiciğe dönüşmesinden, çimlenmeye kadar olan rejenerasyon sürecini kapsayan çeşitli aşamaların histolojik çalışmalarını yapmışlardır. Globular veya torpedo yapılı somatik embriyoların, iyi süspansiyon kültürlerine ve ardından gelişim aşamasında somatik embriyoların geri kazanılmasıyla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Yapmış oldukları morfolojik gözlemleri, tüm aşamaları kapsayan histoloji çalışmaları ile desteklemişlerdir.

Histolojik incelemede pro-embriyoların kallus yüzeyine bağlanan vasküler demet göstermediğini saptamışlardır. Morfolojik ve histolojik çalışmalarla, daha önce elde ettikleri kallusların embriyojenik olduğu ve yarı saydam küresel yapıların ise somatik embriyolar olduğunu doğrulamışlardır. Somatik embriyo oluşumunda gösterge olarak kullanılacak bir diğer faktörün, gelişmekte olan bir embriyonun en dış tabakası olan protodermin varlığı olduğunu belirtmişler ve incelemelerinde, nişasta rezervlerinin birikmesiyle yoğun meristematik embriyojenik hücreleri çevreleyen protodermin varlığını saptamışlardır. Işık mikroskobu ile embriyojenik olmayan kallus gözlemleri için süngerimsi yapılar ortaya çıkarmışlar, bu hücrelerin embriyojenik hücre içermediğini saptamışlardır. Böylece, kallus yüzeyindeki yarı saydam küresel yapıların somatik embriyolar olduğu açıkça doğrulamışlardır. Histolojik çalışmalar ile hem sürgün hem de kök uçlarına ve bu yapıların vasküler bağlantılara sahip iyi gelişmiş somatik embriyolar olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri bitkilerde ise somaklonal varyasyon saptanmadığını belirtmişlerdir.

Bartos ve ark (2018), *C. arabica*'nın yaprak eksplantlarından elde edilen somatik embriyogenezin histo-farklılaşmasını karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Bu nedenle, işlemin: 0, 4, 7, 15 ve 30 günlük yetiştirme sürecinde yaprak kısımlarını, Tip 1 birincil kallus (embriyojenik yeterliliğe sahip birincil kallus) ve Tip 2 ikincil kallus (embriyojenik yeterliliğe sahip olmayan birincil kallus), embriyojenik kallus, globüler, torpedo ve kotiledon embriyoları ve olgun zigotik embriyolarını histolojik olarak analiz etmişlerdir. Kallus oluşumu, prokambiyum hücresinin art arda bölünmesiyle yedi günlük kültürden sonra meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu yetiştirme aşamasında, Tip 1 primer kallusların temel olarak hücreler arası boşlukları azaltılmış parankimal hücrelerden oluştuğu, Tip 2 primer kallusların ise ağırlıklı olarak geniş hücreler arası boşluklara sahip parankimal hücrelerden ve tamamen meristematik hücrelerden oluşan embriyojenik kalluslardan elde edildiği bildirilmiştir. 330 gün sonra, somatik embriyogenezin farklılaşmasından, temel meristemi çevreleyen karakteristik bir protodermden oluşan küresel somatik embriyoların oluşumunun olduğunu, bu propagüllerin 360

gün sonra olgunlaşmasıyla, doku polarizasyonunun ve prokambiyal ipliklerin erken farklılaşmasının doğrulandığı torpido safhasındaki somatik embriyoların ortaya çıktığını belirtmişlerdir. 390 gün sonra, ksilem/floem kanalları dokularındaki farklılaşma başlangıcının doğrulandığı kotiledon safhasındaki somatik embriyoları elde etmişler ve bu özelliği olgun zigotik embriyolarda da gözlemlemişlerdir. *C. arabica* yapraklarından elde edilen somatik embriyoların geliştirilmesi sırasında, bitkilerin rejenerasyona uygun, olgun somatik embriyolar üreten prokambiyum hücre bölünmelerinden başladığı sonucuna varmışlardır.

Ruyue jing ve ark (2019), *Cinnamomum camphora* L.'nin somatik embriyogenesi sırasında üretilen primer, sekonder ve hatalı biçimlendirilmiş embriyolar üzerinde histo-sitolojik çalışmalar yapılmışlardır. Kallus tiplerini ve yapılarını araştırmak, zigotik embriyo mekanizmasına ışık tutabilecek somatik embriyo mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için teorik bir temel sağlamıştır. Somatik embriyoları indüklemek için olgunlaşmamış zigotik embriyoları eksplant olarak kullanmış ve olgun somatik embriyolara farklılaşan birçok embriyojenik kallus oluşturmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlar *C. camphora*'nın somatik embriyogenesi'nin zigotik embriyolar ile benzer olduğunu göstermiştir. Embriyojenik olmayan hücrelerle karşılaştırıldıklarında, embriyojenik hücrelerin, daha büyük çekirdeğe, daha kalın sitoplazmaya, daha fazla nişasta granülüne sahip olup daha kolay siyaha boyandığı sonucuna ulaşmışlardır. *C. camphora*'nın ikincil ve birincil embriyolarının birbirlerine benzer gelişim süreçlerinden geçtiğini sonucuna varmışlardır. Aynı zamanda, içsel etmenlerden kaynaklı anormal embriyolar oluşturma olasılığı daha yüksek olan yapışık kotiledon embriyolar ve morfolojik açıdan anormal embriyolar olduğunu saptamışlardır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü bünyesinde bulunan Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür. Tez çalışmasında bitkisel materyal olarak ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ olmak üzere 2 farklı muz çeşidine ait iki farklı eksplant tipi (olgunlaşmamış dişi ve erkek çiçek tomurcukları) kullanılmıştır.

‘Grand Naine’ (*Musa* AAA, Cavendish subgroup): Kromozom sayısı 33’tür ve partenokarpi yoluyla tohumuz meyveler üretmektedir. Dünya’da yaygın olarak yetiştirilen muz çeşitlerinden biridir. Ticari olarak yetiştiriciliği yapılan ‘Grand Naine’, iyi bir ihracat gücüne sahip Cavendish muz çeşidi grubu üyesidir. Tropik ve subtropik bölgelerdeki muz yetiştiriciliği açısından büyük önem arz etmektedir. 3-4 metre boylanan ‘Grand Naine’ orta boylu ve verimli bir çeşittir. Uzun ve yukarı doğru dik gelişen yaprakları vardır. Hevenkler gelişimini tamamladığında, 1.yıl üzerinde 10-12 tarak, 2.yıl 13-15 tarak muz bulunmaktadır. Sağlıklı kök gelişimi, geniş gövdesi ve meyvesinin uzun parmak yapısı ile ‘Grand Naine’ çeşidi, açıkta yetiştiriciliğe uygun olmasıyla peyzaj bitkisi potansiyeline sahip ve yaprakları rüzgâra karşı direnç sahibidir (Şekil 3.1). Kış doğumlarına dayanıklı, meyveleri kaliteli ve hızlı gelişen, bir çeşittir (Morais-Lino ve ark. 2016). ‘Grand Naine’nin kuraklık ve soğuğa karşı toleransı yoktur. Toprak kaynaklı mantar *Fusarium oxysporum* f’nin neden olduğu fusarium solgunluk hastalığına karşı hassastır. (Robinson ve Saucedo, 2010). Kök ur nematodları (*Meloidogyne spp.*) ve kök çürüklüğüne yüksek dirence sahip olmasından dolayı tercih edilen bir çeşittir. ‘Grand Naine’ dünya toplam muz üretim alanının %44.75’ini oluşturur ve üretimde en fazla tercih edilen çeşittir (Subaşı ve ark. 2016).



Şekil 3.1. Grand Naine

‘Azman’: Türkiye’de ticari önemi yüksek olan Gross Michel (AAA) grubuna ait bir çeşittir. Ülkemiz için yerli bir çeşit olması nedeniyle önemlidir. Yaprakları Cavendish çeşidine göre daha uzun ve yukarı doğru dik gelişmektedir. Meyveleri oldukça lezzetli, iri, parlak ve sarı renktedir. Ağaçları hızlı büyümektedir. Boyları 4-5 metreye kadar ulaşmaktadır. Eylül ayında ortalama hevenk ağırlığı 1.yıl 40-50 kg olup her bir hevenk 10-12 tarak oluşturur. 2.yıl hevenk ağırlığı 40-60 kg, tarak sayısı 13-15 ve gelişimini tamamlamış her bir tarakta 60-100 g ağırlığında uzunluğu 14-18 cm olan 20-25 parmak bulunur (Şekil 3.2). Muz bitkisi meyve ve erkek çiçeklerinin yapısına ait görsel Şekil 3.3’te verilmiştir. Kış doğumlarına ve don zararına karşı diğer muz çeşitlerine göre daha dayanıklıdır. Kök gelişimi iyi, nematod ve kök çürüklüğüne karşı dirençli olması gibi özellikleri nedeniyle tercih edilebilir. Tek ürün yetiştiriciliğine uygun bir çeşittir (Anonim, 2020).



Şekil 3.2. Azman

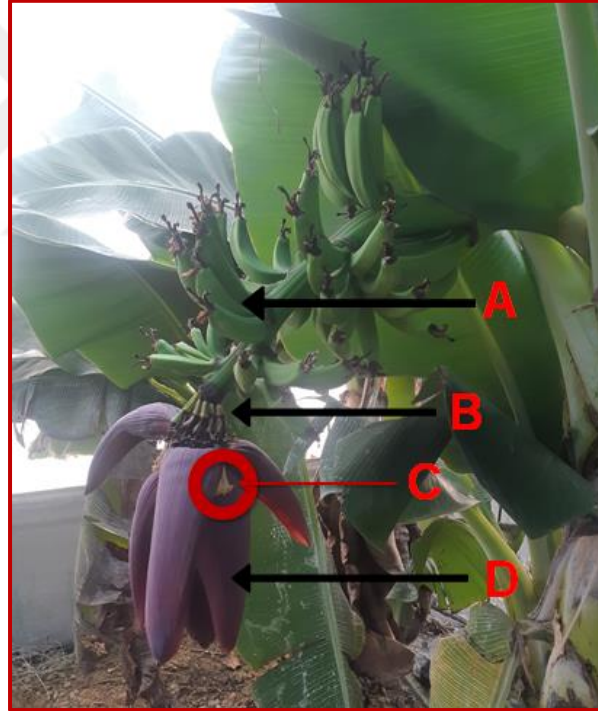


Şekil 3.3. 'Azman'a ait Meyve ve Erkek Çiçeklerin Farklı Evreleri

3.2. Metot

3.2.1. Bitkisel Materyalin Temin Edilmesi

Bitkisel materyal olarak kullanılan olgunlaşmamış Muz çiçek tomurcukları, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi serasında bulunan ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait muz bitkilerinden temin edilmiştir. Öncelikle başlangıç materyali temini için kullanılacak seradaki muz ağaçları arasından en doğru bitki seçimi keşfi yapılmıştır (Şekil 3.4). Belirlenmiş özelliklere sahip olan sağlıklı muz bitkilerinden ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşidi için ayrı olacak şekilde olgunlaşmamış dişi ve erkek çiçek tomurcukları alınarak laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 3.4. ‘Azman’ Bitkisine Ait Çiçeklenmenin Görünümü, A) Olgunlaşmamış Meyveler, B) Olgunlaşmamış Dişi Çiçek, C) Erkek Çiçek Tomurcuğu (Erkek çiçekler mor braktenin altında yer almaktadır), D) Erkek Çiçek

Laboratuvara getirilen materyallerden olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları, mor brakte yapraklı çiçek konisinden 10 cm boyuta ulaşınca kadar küçültülecek şekilde (Şekil 3.5) temizlenip, 0-15 pozisyonundaki brakte yapraklar steril kabin içerisinde açılmıştır.

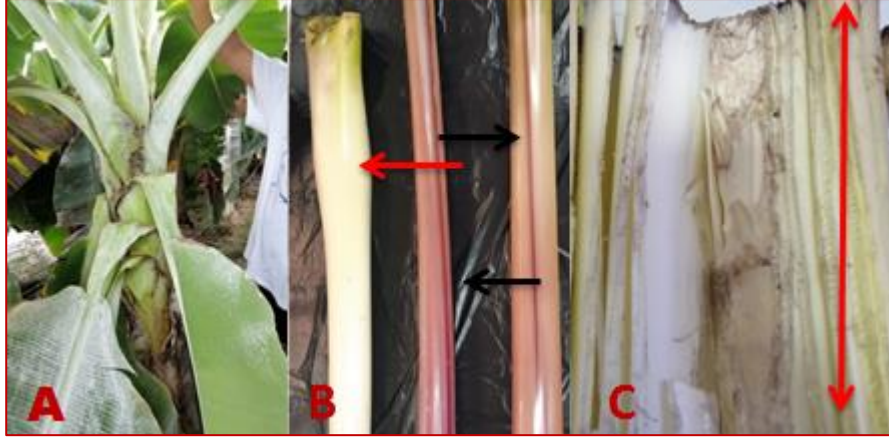


Şekil 3.5. Muz Bitkisi Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu

Olgunlaşmamış dişi çiçek tomurcukları sağlıklı ve yaklaşık 7 aylık olan 22-25 yaprak oluşturmuş bitkinin toprak yüzeyinden itibaren 1 m uzunlukta olacak şekilde kesilerek laboratuvara getirilmiştir. Yeni salkım oluşturmuş olan muz çiçek salkımında bulunan olgunlaşmamış dişi çiçek tomurcukları da materyal olarak kullanılmak üzere laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.6). Muz bitkisinin yalancı gövdesi üzerinde farklılaşmış dişi çiçeklerin varlığını gösteren şişkin kısma ulaşana kadar yalancı gövdeyi oluşturan yapraklar yavaş yavaş kesilerek uzaklaştırılmıştır. Dişi çiçek tomurcuklarına ulaşıldıktan sonra yaklaşık 10 cm'lik tomurcuklar bitkisel materyal olarak kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 3.7). Olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarına ait ayrıntılı görüntüler Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.6. 'Azman' ve 'Grand Naine' Çeşitlerine Ait Çiçeklenme ve Tomurcuk Oluşumu, A) 'Azman' Çeşidine Ait Çiçek Tomurcuğu, B) 'Grand Naine' Çeşidine Ait Çiçek Tomurcuğu



Şekil 3.7. Muz Bitkisi Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğu Belirleme Aşaması, A) Çiçeklenme Dönemine Girmek Üzere Olan Muz Bitkisinin Seçilmesi, B) Dişi Çiçek Tomurcuğunun Yalancı Gövdede Farklılaşmış Yapısının Görünümü, C) Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğunun Yalancı Gövde İçerisinde Görüntüsü

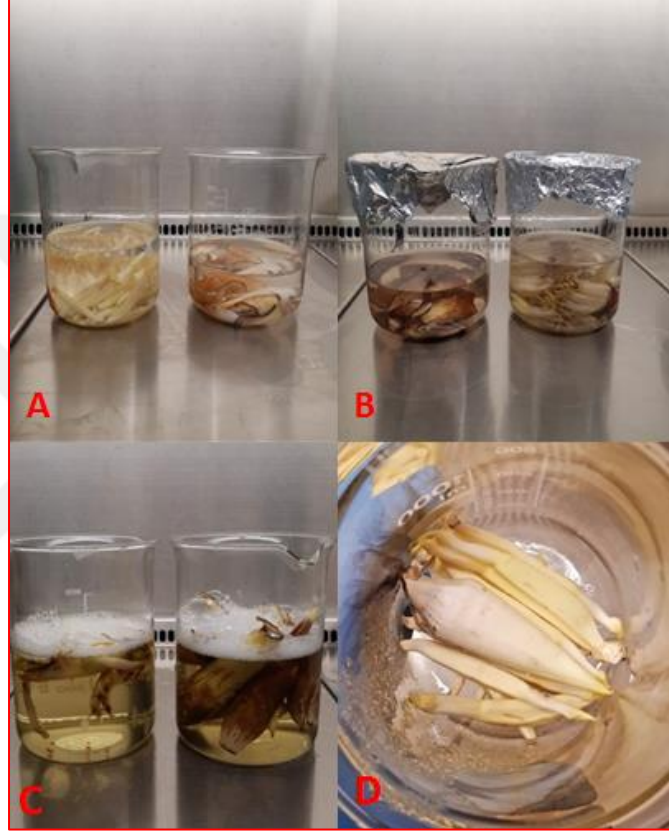


Şekil 3.8. 'Grand Naine' ve 'Azman' Erkek Çiçek Tomurcuklarının Brakte Yapraklarından Ayrılması Aşaması, A) 'Grand Naine' Erkek Çiçek Tomurcuğu, B) 'Azman' Erkek Çiçek Tomurcuğu, C) 'Grand Naine' Çiçek Salkımı ile Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu Görünümü, D) 'Grand Naine' Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu, E) 'Azman' Erkek Çiçek Tomurcuğu Görünümü

3.2.2. Olgunlaşmamış Erkek ve Dişi Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu

Bitkisel materyale ait tomurcuklar steril kabin içerisinde önce %70'lik etil alkolde 15 dk bekletilip ardından, %10'luk sodyumhipoklorit + 1-2 damla tween 20

çözeltisinde 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra 3-4 kez steril saf su ile çalkalanarak yıkanmış olan çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Sterilizasyon Aşamaları A, B) Olgunlaşmamış Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcuklarının %70'lik Etil Alkol'de Bekletilmesi, C) %10'luk NaOCl'de Bekletilen Olgunlaşmamış Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcukları, D) Tomurcukların Steril Saf Su ile Yıkama İşlemi

3.2.3. Eksplantların Kültüre Alınması ve Kültür Koşulları

Olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları sterilizasyon işlemi sonrası steril kabin içerisinde, pens ve bistüri kullanılarak çiçek sarmalında 0-15 pozisyonundaki olgunlaşmamış erkek çiçek kümeleri çıkarılmış ve kallus indüksiyonu için eksplant

olarak kullanılmıştır. Braktelerin iç katmanları, çiçek eksenini 1,5 cm uzunluğunda olacak şekilde soyulup ve gelişen erkek çiçek tomurcukları primordiumları, sapın tabanından nazikçe kesilerek çıkartılmış ve önceden hazırlanmış 0,175 mg/l IAA ve 0,550 mg/l TDZ ile desteklenmiş MS besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.10). Kallus oluşumu için kültürler, karanlık koşullar altında $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Kültüre alınan olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları 4 haftada bir olacak şekilde 3 kez altkültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış dişi çiçek tomurcuklarından embriyojenik kallus elde etmek amacıyla çiçek kümelerinin brakteleri steril kabin içerisinde pens ve bistüri yardımı ile 3-5 mm küçültülmüş dişi çiçek tarakları ince kesitler şeklinde eksplant olarak kullanılmak amacıyla önceden hazırlanmış 0,175 mg/l IAA ve 0,550 mg/l TDZ ile desteklenmiş MS besin ortamında karanlık koşullar altında $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır (Şekil 3.11). Kültüre alınan tomurcuklar 4 haftada 1 olacak şekilde 2 kez altkültüre alınmıştır.



Şekil 3.10. Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğunun Kültüre Alınması



Şekil 3.11. Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğunun Kültüre Alınması

3.2.4. Olgunlaşmamış Erkek ve Dişi Çiçek Tomurcuklarının Kültüre Alınması Besin Ortamı

Sterilizasyon sonrası çiçek tomurcukları, 0,175 mg/l IAA, 0,550 mg/l TDZ, 30 g/l süktroz ve 7 g/l agar içeren MS besin ortamında karanlıkta bekletilmiştir. *In vitro* çalışmalarda, sterilize edilmiş MS besin ortamı, Laminar Flow Kabin içerisinde her petriye (20x100 mm) 30 ml olacak şekilde dökülmüştür. Ardından muz eksplantları, steril kurutma kağıtları üzerinde 3-5 mm çapında olacak şekilde bistüri ve pens yardımı ile parçalara ayrılarak MS besin ortamında 26±2°C sıcaklıktaki büyütme odalarında, karanlıkta kültüre alınmışlardır. Denemeler, 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 petri ve her petride 5 eksplant olacak şekilde kurulmuştur.

Olgunlaşmamış erkek ve dişi çiçek tomurcuklarında 15/30 günde bir gözlem alınmış ve 4 haftada bir altkültüre alınmıştır. Alt kültür sırasında % kallus oluşumu ve oluşan kallusların morfolojisi gözlemlenmiştir. MS besin ortamı içeriği Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Gözlem sırasında rejenerasyon, kallus oluşumu ve embriyo dönüşüm oranları incelenmiştir. Her 4-6 haftada bir eksplantlar altkültüre alınmıştır. Besin ortamı hazırlığı aşamaları Şekil 3.12’de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Besin Ortamı Hazırlığı Aşamaları

Çizelge 3.1. MS (Murashige and Skoog, 1962) Besin Ortamı İçeriği

Bileşik	Konsantrasyon(mg/l)
Makro Elementler (MS, 1962)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.0
KH ₂ PO ₄	170.0
KNO ₃	1900.0
NH ₄ NO ₃	1650.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0
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
Organik Bileşikler (MS, 1962)	
Sakkaroz (g/l)	30-50
Myo-inositol	100
Nikotikasit	0,5
PiridoksinHCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Glisin	2,0

3.2.5. Kallus ve Somatik Embriyo Geliştirme Ortamı

Bitkisel materyali kültüre alma besin ortamında, 2 kez altkültürü yapılan çiçek tomurcuklarından elde edilen kalluslar ile deneme kurulmuştur. Eksplantlar farklı büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları (0,5, 1,0, 2,0 mg/l 2,4-D ve 0,5/0,05, 1,0/0,05 mg/l Pikloram/BAP), 30 g/l sükröz ve 8 g/l agar içeren MS besin ortamında kallus-1 (Cl-1) ve kallus-2 (Cl-2) olmak üzere 2 farklı MS besin ortamında 5'er tekerrür olacak şekilde kültüre alınıp karanlıkta bekletilmiştir. Söz konusu besin ortamı içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir. Tez çalışması kapsamında belirlenmiş olan deneme deseni Çizelge 3.3'te verilmiştir. Altkültürler sırasında eksplantlara ait kallus büyüme yüzdeleri, kallus yoğunluğu, kallus rengi, renk yoğunluğu, kallus yapısı ve farklılaşmış yapı parametrelerini incelemek amacıyla gözlemler alınmıştır. Ortamlar arasındaki farklılığı tespit etmek için ortalamaları hesaplanırken Çizelge 3.4'te verilen numaralandırma tablosundan yararlanılmıştır

Kallus geliştirme ortamında elde edilen embriyojenik yapılar 1,0 mg/l Pikloram, 0,05 mg/l BAP ilave edilmiş 30 g/l sükröz, 8 g/l agar içeren MS besin ortamında çoğaltılarak embriyolara dönüşümleri sağlanmıştır. Somatik embriyolar belirgin duruma gelene kadar aynı MS besin ortamında indüklenmiş ve yapılan altkültürler sırasında, kallusların gelişimi, % embriyo oluşumu ve somatik embriyoların tipi gözlemleri alınmıştır. Elde edilen somatik embriyoların büyümeleri ve farklılaşmalarını hızlandırmak amacıyla 30 g/l sükröz, 8 g/l agar ve 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır ve 2 altkültür boyunca aynı ortamda indüklenmeye devam edilmiştir

Çizelge 3.2. Kallus Geliştirme Ortamı

	EKSPLANT	Kallus Geliştirme Ortamı (CI)		
		CI-1		CI-2
		2,4D (mg/l)	Picloram (mg/l)	BA (mg/l)
GRAND NAİNE	Olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları	0	0	0
		0,5	0,5	0,05
		1	1	0,05
	Olgunlaşmamış dişi çiçek tomurcukları	2	-	-
		0	0	0
		0,5	0,5	0,05
AZMAN	Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcukları	1	1	0,05
		2	-	-
		0	0	0
	Olgunlaşmamış dişi çiçek tomurcukları	0,5	0,5	0,05
		1	1	0,05
		2	-	-

Çizelge 3.3. Kallus Geliştirme Ortamı Deneme Planı

Besin Ortamı	Çeşit	
	AZMAN	GRAND NAİNE
Kontrol	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
0,5 mg/l 2,4-D	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
1,0 mg/l 2,4-D	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
2,0 mg/l 2,4-D	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
0,05 mg/l BAP+ 0,5 mg/l Pikloram	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
0,05 mg/l BAP+ 1,0 mg/l Pikloram	5 petri (Her petride 5 eksplant)	5 petri (Her petride 5 eksplant)
	30 petri	30 petri
Toplam	60 petri (300 eksplant)	

Çizelge 3.4. Kallus Gelişimine Ait Gözlem Tablosu

Kallus Gelişimi Gözlem Tablosu				
Kallus Büyüme	Büyüme Yok	%30-50	%50-%100	Hücre Artışı> %100
	0	1	2	3
Kallus Yoğunluğu	Çok Yumuşak	Yumuşak	Orta	Sert
	0	1	2	3
Kallus Rengi	Beyaz-Krem	Krem	Krem-Kahve	Kahve
	1	2	3	4
Renk Yoğunluğu	Açık	Orta	Koyu	Çok Koyu
	1	2	3	4
Kallus Yapısı	Kompakt	Kırılgan	Çok Kırılgan	Homojen 4 Pamuksu 5
	1	2	3	Müsilajlı 6
Farklılaşmış Yapı	Yok	Kök	Sürgün	Embriyojenik Yapı
	0	1	2	3

3.2.6. Histolojik Analizler

Deneme sonucunda kallus oluşum aşamalarında belirlenen en iyi konsantrasyonları içeren (0,05 mg/l BAP + 1,0 mg/l Pikloram) besin ortamında histoloji analizlerinde kullanmak üzere yeni bir deneme kurulmuştur.

Çalışmada ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarında somatik embriyogenesis sonucunda oluşan embriyo yapılarının gelişim durumlarını belirlemek amacıyla histolojik analizler yapılmıştır. Bu amaçla farklı aşamalarda gelişen yapılar ve farklı ortamlardan örneklemeler yapılmıştır.

3.2.6.1. Örneklerin Fiksasyon Solüsyonu ile Muamele Edilmesi

Alınan örnekler FPA 70 tespit sıvısı (FPA: formaldehit: propiyonik asit: alkol) (900 ml %70’lik alkol + 50 ml propiyonik asit +50 ml formaldehit) içerisinde fikse edilerek incelenene kadar bekletilmiş ve ‘Parafine gömme’ yöntemi kullanılarak mikrotomda ince kesitleri alınmıştır (Karabıyık, 2019).

3.2.6.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçerisine Alınması

Parafine gömme yönteminde örneklerin kesit işlemine hazırlanması amacıyla, örnek bünyesinde bulunan suyun alınması için artan alkol konsantrasyonlarına sahip saf su, Etil alkol ve Tersiyer butil alkol (TBA) içeren Johansen karışımları içerisinde üçer saat süreyle bekletilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Johansen Karışımlarında Kullanılan Saf Su, Etil Alkol ve Tersiyer Bütil Alkol (TBA) Miktarları (ml)

Karışım	Saf Su	EtilAlkol	TBA
Johansen 1 (%70)	300	500	200
Johansen 2 (%85)	150	500	350
Johansen 3 (%95)	-	450	550
Johansen 4 (%100)	-	200	800

Örneklerin %100'lük Johansen çözeltisi (Johansen 3) içerisinde bulunduğu sırada, 30 dakika süreyle desikatör içerisinde vakum pompası kullanılarak örneklerin havalarının alınması ve tamamen alkol ile dolması sağlanmıştır. Ardından, TBA-1 (Saf Tersiyer butil alkol) TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde yine 7-8 saat bekletilen örnekler, bekleme süresinin sonunda önceden 60-65°C'lik etüvde petri kapları içerisinde eritilmiş sıvı parafin içerisine alınmıştır. Bu şekilde en az 3 gün süreyle etüv içerisinde bekletilen örneklerde alkolün uçması ve parafinin dokulara geçmesi sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda buz üzerinde parafin sertleştirme işlemi yapılarak hazırlanmış olan örneklerin tamamen sertleşmesi için +4°C'de 1-2 gün bekletilmiştir. Ardından, kalıplar halindeki örneklerin etrafındaki fazla parafin kesilerek örnekler tahta bloklar üzerine monte edilmiştir. Bu örneklerden rotasyon mikrotom ile 10 µ kalınlığında kesitler alınmıştır.

Elde edilen parafin şeritler 1:1 oranında yumurta akı ve gliserin karışımı sürülmüş lamlar üzerine yerleştirilmiş ve hazırlanan lamlar 35-40°C sıcaklığındaki sıcak yüzey (Hot plate) üzerine konularak lamla kesitler arasına saf su

damlatılmıştır. Bu şekilde ısı etkisiyle parafinin su üzerinde gerginleşerek suyun buharlaşmasından sonra gergin bir şekilde lam üzerine yapışması sağlanmıştır. Bundan sonra 30-35°C'lik etüvde bir gece bekletilerek tamamen kuruması sağlanan lamlarda boyama işlemine geçilmiştir.

3.2.6.3. Örneklerin Hematoxylin Boya Çözeltisi ile Boyanması

Boyama sırasında lam taşıyıcılar ilk önce onar dakika sürelerle saf ksiloldan oluşan 'ksilol-1' ve 'ksilol-2' dolu küvetlerde bekletilmiş ve bu şekilde örnekler etrafındaki fazla parafinin ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra, örnekler beşer dakika 'izopropil alkol-1' ve 'izopropil alkol-2'de; ardından üçer dakika konsantrasyonları giderek azalan alkol küvetlerinde (%96, %70, %40 ve %20) ve en son da saf su ile dolu küvet içinde bekletilerek örneklerin bünyesine su alarak boyayı kabul edebilir düzeye gelmesi sağlanmıştır. Ardından, örnekler 'Hematoxylin boya çözeltisi' içerisinde 30 dakika bekletilmesi ile dokuların boyanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin boyanması tamamlandıktan sonra, lamlar lam taşıyıcıyla sürekli akan musluk suyu altında fazla boyadan arındırmak için 15 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, örnekler bu kez konsantrasyonu giderek artan alkol serilerinde (%20, %40, %70 ve %96) bu kez kurutma amacıyla yine 3'er dakika; 'izopropil alkol-1' ve 'izopropil alkol-2'de ise beşer dakika bekletildikten sonra en son temiz ksilol (ksilol-3) kabı içerisine alınmıştır.

Tüm bu işlemler ile boyanması tamamlanan lamlar devamlı preparat haline getirilmek amacıyla her lamelin altına birer damla gelecek şekilde "Entellan" adlı şeffaf bir yapıştırıcı kimyasaldan damlatılıp kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar bu şekilde 30°C'deki etüvde 3 gün süreyle bekletilerek kurutulmuş ve devamlı preparatlar elde edilmiştir.

Elde edilen devamlı preparatlar Olympus BX51 floresan-ışık mikroskobu altında incelenerek DX 7200 fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

3.2.7. Farklılaşma ve Çimlenme

Eksplantlar, son 4 haftalık kültür periyodunun ardından, MS-HF (hormonsuz) besin ortamına aktarılmıştır. Bu safhada, embriyolar ayrılarak bireysel olarak hormon içermeyen farklılaşma ortamlarında kültüre alınmıştır. Somatik embriyolar 22-25°C’de ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gelişerek, 3-5 mm büyüklüğe ulaştıkları zaman, kök ve kotiledon yapraklarını içerip içermedikleri gözlemlenmiştir. Çimlenmiş embriyolar, gelişip iyi bir kök sistemi ve gerçek yaprakları oluşturana kadar, her 4 haftada bir altkültüre alınmıştır. Bitkicikler, hormonsuz MS besin ortamına transfer edildikten 2-4 ay sonra, dış koşullara alıştırmaya aşamasına geçilmiştir.

3.2.8. Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Başlangıç materyalleri ile somatik embriyolardan gelişen bitkilerin genetik kararlılığının belirlenmesi için SSR markır sistemi kullanılmıştır. Söz konusu çalışma için başlangıçta kullanılmış olan olgunlaşmamış erkek ve dişi çiçek tomurcuklarının alındığı bitkinin yaprak örnekleri ile bunlardan gelişen somatik embriyolar -196°C’de sıvı azota daldırılıp ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.9. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için farklı dönemlerde alınan materyallere ait dokular sıvı azota daldırılarak havanda öğütülmüştür. Ardından 1.5 ml’lik santrifüj tüplerine yerleştirilmiş (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. DNA İzolasyonu İçin 'Azman' ve 'Grand Naine' Yapraklarının Sıvı Azotla Muamele Edilerek Havanda Öğütülmesi

3.2.10. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

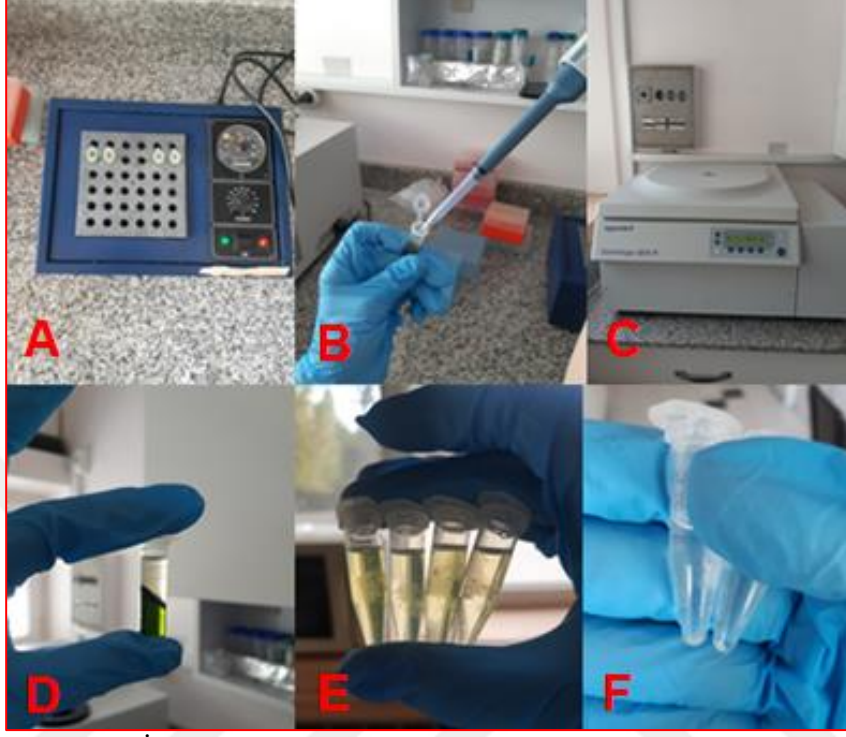
Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Dellaporta ve ark. 1983). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.6.'da verilmiştir. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform: izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, EDTA: 0,5 M pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (% 99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan Tampon Çözeltisinin İçeriği

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	%2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) Ph 8,0	0.2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0.1 M

3.2.11. DNA İzolasyon Aşamaları

- * Hazırlanmış ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396 µl ve 4 µl β-merkaptöetanol eklenmiştir.
- * Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 65°C'de 20 dakika bekletilip ve iki defa karıştırılmıştır.
- * Her tüpe 400µl kloroform: izoamilalkol eklenecek ve 15 dakika karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
- * Tüpler 5 dakika 13 000 devirde santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiş ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
- * Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 mikrolitre soğuk (-20°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat -20°C'de bekletilmiştir.
- * Bir saatin ardından tüpler 5 dakika 13 000 devirde santrifüj edilmiştir.
- * Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülerek pelletin kuruması için tüpler ters bırakılıp bekletilmiştir.
- * Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNAase A eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
- * Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenip ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat -20°C'de bekletilmiştir.
- * 5 dakika 13 000 devirde santrifüj edilmiştir.
- * Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülerek ve pelletin kuruması için tüpler ters çevirilmiştir.(yaklaşık 10 dakika).
- * Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- * Örnekler -20°C'de saklanmıştır.

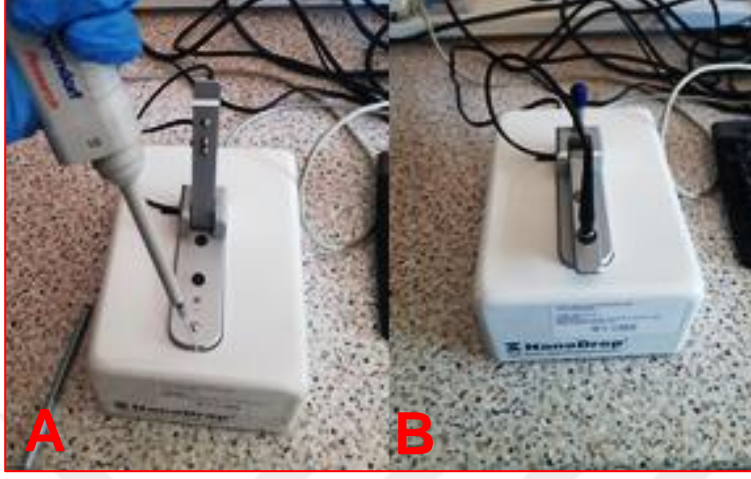


Şekil 3.14. DNA İzolasyonu Aşamaları

- A. Örneklerin bulunduğu tüplerin 65°C'de 20 dk inkübasyonu
- B. Tüplere kloroform:izoamilalkol eklenmesi
- C. Tüplerin santrifüj edilmesi
- D. Süpernatant'ın alınması
- E. Süpernatant'ın izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılması
- F. İzolasyonu tamamlanmış DNA pelleti

3.2.12. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiş olup Şekil 3.15' de verilmiştir.



Şekil 3.15. DNA Kalite ve Miktarının Spektrofotometre ile (Nanodrop ND 100) Ölçülmesi A. Nanodrop Cihazına Örneklerin Yüklenmesi B. DNA Kalitesi ve Miktarının Ölçülmesi

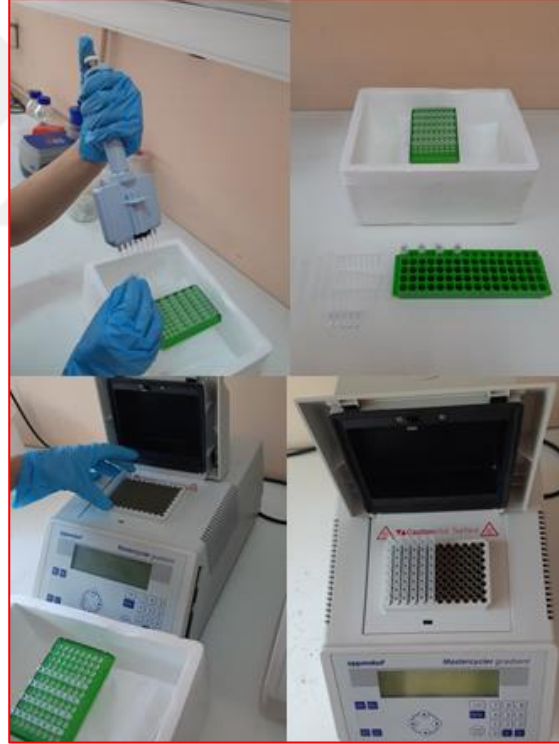
3.2.13. SSR- PCR Koşulları

'Grand Naine' ve 'Azman'ın bitki materyallerine ait DNA'lar ve sentetik olarak tasarlanan SSR primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan PCR protokol ve PCR döngü koşulları aşağıda belirtilmiştir.

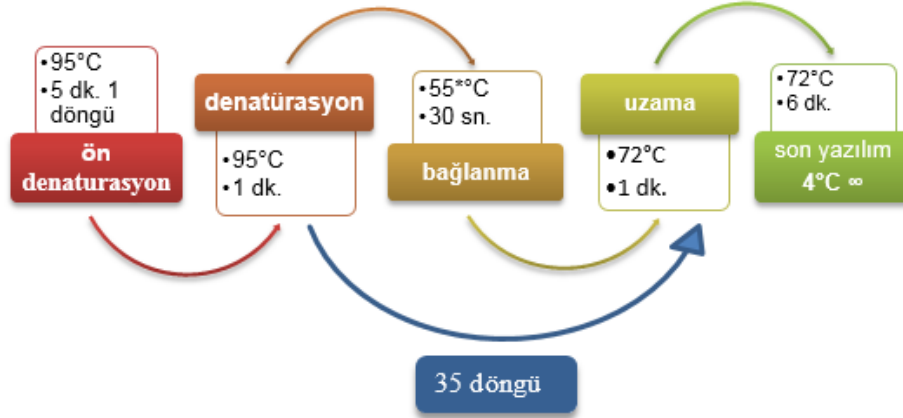
PCR Reaksiyon Koşulları; Toplam hacim: 20 µl olacak şekilde Çizelge 3.7'de verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmalarına ait görüntüler Şekil 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.7. PCR Reaksiyon Koşullarının İçeriği

Kullanılan Kimyasallar	Her Örnek için Kullanılan Miktar (μ l)
PCR Master Mix 2X	8,00
MgCl ₂	0,50
M13 primer (Forward&Reverse)	0,50
F + R primer	1,00
DNA (5ng)	5,00
ddH ₂ O	5,00
Toplam Hacim	20



Şekil 3.16. PCR Reaksiyonlarının Kurulması



Şekil 3.17. PCR Reaksiyonları Döngü Programı

* Her primer için annealing sıcaklığı ayrı ayrı belirlenmiştir.

3.2.14. SSR Primerlerinin Belirlenmesi

SSR analizlerinde 3 adet Crouch ve ark, (1998), 4 adet Lagoda ve ark, (1998) ve 5 adet Creste ve ark, (2004) tarafından geliştirilen toplam 12 mikrosatellit primeri kullanılmıştır (Mattos ve ark, 2010). Kullanılan primerler Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. SSR Analizlerinde Kullanılan Primerler

PRİMER ADI	SEKANS BİLGİSİ	
AGMI 24-25	F: TTTGATGTCACAATGGTGTTC	Lagoda ve ark, (1998)
	R: TAAAGGTGGTTAGCATTAGG	
AGMI 67-68	F: ATACCTTCTCCCGTTCTTCTTC	
	R: TGGAAACCCAATCATTGATC	
AGMI 93-94	F: ACAACTAGGATGGTAATGTGTGGAA	
	R: GATCTGAGGATGGTTCTGTTGGAGTG	
AGMI 103-103	F: CAGAATCGCTAACCCCTATCCTCA	
	R: CCCTTTGCGTGCCCTAA	
MA 1-17	F: AGGCGGGAATCGGTAGA	Crouch ve ark, (1998)
	R: GGCGGAGACAGATGGAGT	
MA 3-103	F: TCGCCTCTCTTTAGCTCTG	
	R: TGTTGGAGGATCTGAGATTG	
MA 1-27	F: TGAATCCCAATTTGGTCAAG	Creste ve ark, (2004)
	R: CAAAACACTGTCCCATCTC	
MAOCEN 01	F: TCTCAGGAAGGGCAATC	
	R: GGACCAAAGGGAAAGAAACC	
MAOCEN 03	F: GGAGGAAATGGAGGTCAACA	
	R: TTCGGGATAGGAGGAGGAG	
MAOCEN 10	F: GGAAGAAAGAAGTGGAGAATGAA	
	R: TGAAATGGATAAGGCAGAAGAA	
MAOCEN 12	F: GCAAGAAAGAACGAGAAGGAAA	
	R: GTGGGGAGGGAGGCATAG	
MB 1-100	F: TCGGCTGGCTAATAGAGGAA	Oriero ve ark, (2006)
	R: TCTCGAGGGATGGTGAAGA	

3.2.15. Li-Cor için Poliakrilamide Jel Hazırlığı

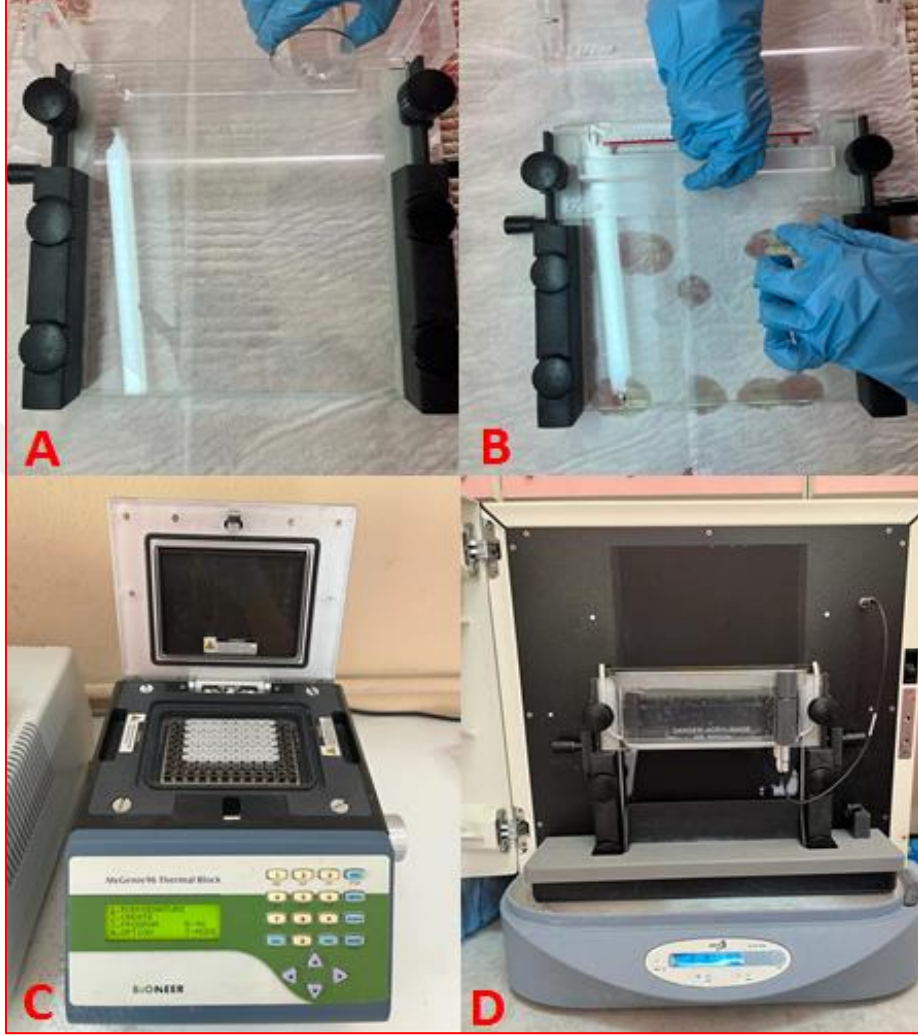
Laboratuvar çalışması sonucunda elde edilen PCR ürünlerini koşmak amacıyla %6,5 poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bu jelin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların listesi ve kullanılan miktarları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Li-Cor Poliakrilamide Jel İçin Kullanılan Kimyasallar

Üre	8.4 g
%50 LongRangerAkrilamide	2.4 ml
10X TBE Buffer	2.0 ml
TEMED	15 µl
Ammonium persulfate(APS-%10)	150 µl

3.2.16. Li-Cor Elektroforez Koşulları

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra aparat Li-Cor Elektroforez cihazına yerleştirilmiştir. Poliakrilamid jel hazırlığı ve aparatın Li-Cor Elektroforez cihazına yerleştirilmesi ile ilgili görüntüler Şekil 3.17’de verilmiştir. Cihazda çalışma değerleri; 1000 V, 35 mA, 25 W 45°C’de yaklaşık 30 dk. ön ısıtma yapılarak ardından eşit miktarda formamide yükleme buffer’ı eklenmiştir ve PCR’da 95°C’de 4 dk denatüre edilen örneklerden 1 µl jel’e pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35 mA, 50 W 48°C’de jel koşullarında 1,5 saat koşturulmuştur.



Şekil 3.18. Poliakrilamid Jel Hazırlanması ve Li-Cor Elektrofrez Cihazı. A. Jelin Aparata Dökülmesi, B. Aparata Tarağın Yerleştirilmesi, C. DNA'ların PCR'da 95°C'de Denatüre Edilmesi D. Aparatın Li-Cor Elektrofrez Cihazına Yerleştirilmesi

3.2.17. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

'Grand Naine' ve 'Azman' çeşitlerinde somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu eldesi isimli tez çalışmasına ait kurulan denemelerin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme deseni uygulanmıştır. Deneme deseni: 2 çeşit X 2 ortamdır.

Somatik embriyo yoluyla bitki rejenerasyonu amaçlanan bu tez çalışmasında, giriş ortamında gelişen kallusların 4. haftadan itibaren kallus oluşturma yüzdesi (%) hesaplanarak, kallus tipleri (Kompakt, kırılabilir ve saydamlık) ve kallus renkleri (Beyaz, krem, kahverengi, yeşil, sarımsı) kategorize edilmiştir. Kallusların yapısı, kallus oluşumu gerçekleşiminin 4. haftasından itibaren makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Kallus başına gelişen ortalama embriyo sayısı; deneme planındaki herhangi bir uygulamaya yanıt veren eksplant başına üretilen somatik embriyoların ortalama sayısıdır. Kallusların rengi ve genel durumları belirlenmiştir. Kallusların bitkiye dönüşüm oranları incelenmiştir. Gelişen embriyoların tipleri (Globular, kalp, torpedo, kotiledon) kategorize edilmiştir. Somatik embriyolardan gelişen bitkicikler 4 haftada bir olmak üzere 3 kez altkültüre alınmıştır.

Köklenmiş bitkilerde, 3 alt kültür sonunda incelenmiş olan kriterler;

*Bitki boyu (cm)
*Yaprak sayısı (adet)
*Kök sayısı (kök/bitki),
*Kök uzunluğu (cm)
*Klorofil miktarı (spad değeri)

Somatik embriyolardan gelişmiş olan bitkiler ile ilgili parametrelerin incelenme kriterleri aşağıda tanımlanmıştır.

Bitki boyu	Bir bitkinin basal kısımdan itibaren sürgün ucuna kadar cetvel yardımı ile boyunun ölçülerek belirlenmesidir.
Yaprak sayısı	Bir bitkinini tüm yaprak sayısını ifade etmektedir.
Kök sayısı	Bir bitkinin basal kısmından oluşan kök sayısını ifade etmektedir.
Kök uzunluğu	Bir bitkinin basal kısmından oluşan köklerin uzunluğunun cetvel yardımı ile ölçülerek belirlenmesidir.
Klorofil miktarı	Açık havadaki bitkilerin yapraklarından öğleden sonra (14:00-16:00) spad cihazı yardımıyla okunan değerdir.

Tez çalışmasında elde edilen yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmıştır. Somatik embriyolardan gelişen bitkilerde incelenen parametrelere ait veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. İstatistik analizlerde JMP 8.01 programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerinin olgunlaşmamış erkek ve dişi çiçek tomurcukları eksplantlarının, somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu, histolojik analizleri ve moleküler çalışmalarına ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.1. Bulgular

4.1.1. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Çeşitlerinde Somatik Embriyogenesis Bulguları

4.1.1.1. Yüzey Sterilizasyonuna Ait Bulgular

Tez çalışmasında, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ olgunlaşmamış dişi ve erkek çiçek tomurcukları steril kabin içerisinde %70’lik etil alkolde 15 dk, %10’luk NaOCl + 1-2 damla tween 20 çözeltisinde 5 dk. bekletilmiştir. Bu protokol ile %100 başarı sağlanmış, iki çeşitte de sterilizasyondan kaynaklı kontaminasyon problemi ile karşılaşılmamıştır. Bu nedenle tez çalışması için yüzey sterilizasyonunda farklı yöntemlere başvurulmamıştır.

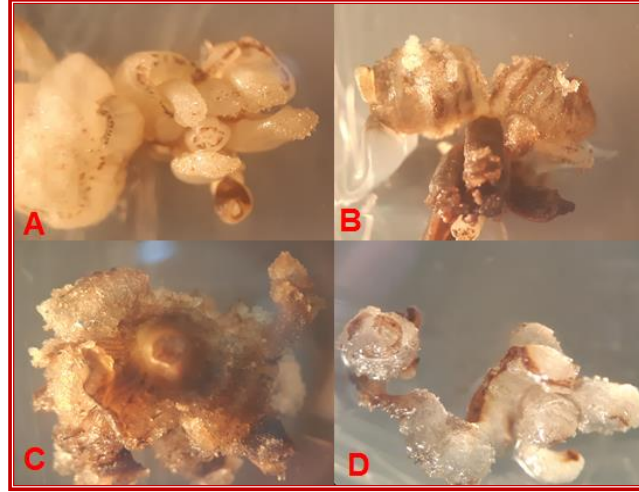
4.1.1.2. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ Olgunlaşmamış Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcuklarına Ait Kallus Oluşturma Bulguları

Somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonunu en iyi şekilde sağlamak ve eksplant kaynağında kallus oluşturma başarısını gözlemlemek amacıyla ön deneme kurulmuştur. Ön deneme sırasında 10 cm’e kadar küçültülen erkek çiçek tomurcuğunun, brakte yapraklarının altındaki çiçek kümelerinin çeşitli aşamaları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda en iyi eksplant kaynağının 0-15 pozisyonundaki olgunlaşmamış erkek çiçek kümelerinden çıkarılan tomurcuklar olduğuna karar verilmiştir.

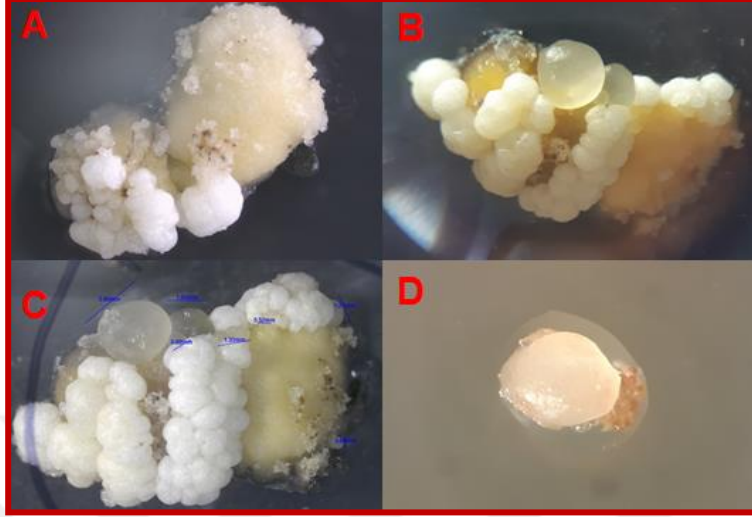
Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış olan ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşidine ait olgunlaşmamış dişi ve erkek çiçek tomurcukları eksplantlarında kallus

oluşumu sağlamak amacıyla 0,550 mg/l TDZ ve 0.175 mg/l IAA, 30 g/l Sükroz, 7 g/l Agar içeren MS besin ortamında kültüre (4-8 hafta) alınmıştır. İlk denemelerde kallus oluşumu sağlanması amacıyla olgunlaşmamış erkek ve dişi çiçeklerinin farklı çiçek pozisyonları ve kısımları 3 altkültür boyunca giriş ortamında kültüre alınmıştır. Altkültür sırasında gözlemlenen yüzde kallus oluşumları, ‘Grand Naine’ olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarında %58,75 ve olgunlaşmamış dişi çiçek eksplantlarında %46,6, ‘Azman’ olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarında %32,6 olgunlaşmamış dişi eksplantlarında ise %54,6 olup ortama yanıt veren eksplantlar yaklaşık 3 haftada kallus oluşturmuştur. Kallus oluşumlarına ait görüntüler şekil 4.1’de verilmiştir.

‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ olgunlaşmamış dişi çiçek eksplantlarının, altkültürler boyunca salgıladığı fenolik maddeler nedeni ile gelişim göstermemiştir. Ayrıca başlangıç materyali olarak muz hevenki oluşturacak olan dişi çiçeklerin kullanılması, üretici için ekonomik kayıba neden olacaktır. Bu nedenlerden dolayı dişi çiçek ile ilgili çalışmalara devam edilmemiştir. Çalışma süresince gözlemlenen gelişmeler Şekil 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu Eksplantlarında Kallus Oluşumu A-B. 0,550 mg/l TDZ+ 0.175 mg/l IAA İçeren Ortamda Şişkinleşme Gösteren Erkek Çiçeklere Ait Eksplant C-D. Kallus Oluşturmuş Eksplantlar



Şekil 4.2. Olgunlaşmamış Dişi Çiçek Tomurcuğu Eksplantlarında Curds (İsmi ile tanımlanan karnabaharimsi) Yapıların Oluşumu A. Eksplantlarda 8 Haftada Curds Oluşumlarının Başlangıcı B-C. Curds Yapılarının Embriyojenik Kallus Rejenerasyonu D. Oluşan Yapının Kültüre Alınması

4.1.1.3. ‘Azman’ Ve ‘Grand Naine’ Muz Çeşitlerine Ait Kallus Geliştirme ve Somatik Embriyo Bulguları

‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarına ait eksplantlar her 4 haftada bir Kontrol, CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D), CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D), CL-1-3 (1.5 mg/l 2,4-D), C-2-1 (0,05 mg/l BAP- 0,5 mg/l Pikloram) ve CL-2-2 (0,05mg/l BAP-1.0 mg/l Pikloram) ortamlarında altkültüre alınmıştır. Tez kapsamında kallus gelişimini indüklemek için belirlenmiş olan deneme deseninde ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ eksplantları, yalnız 2,4-D (0; 0,5; 1.0; 2.0 mg/l) ve BAP+Pikloram konsantrasyon/ kombinasyonlarını (0,05+0,5; 0,05+1 mg/l) içeren MS besin ortamında optimize edilmiştir.

Eksplantların kallus geliştirme düzeyleri altkültürler boyunca gözlemlenmiştir. Alınan gözlemler sonucu metotta daha önce bildirilen numaralandırma tablosu kullanılarak elde edilen ortalama veriler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’

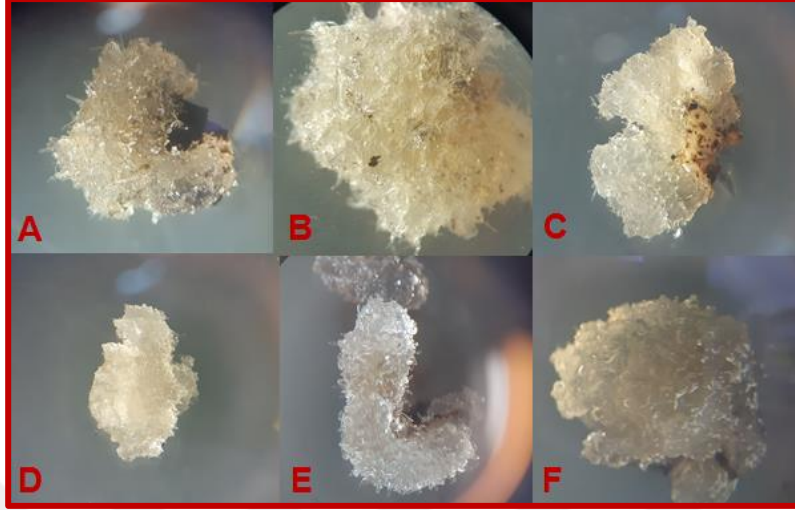
çeşidi için, kallus büyümesi değerlendirildiğinde, ortamlar arasında belirgin farklılık gözlemlenmemiştir. Kallus yoğunluğu değerlendirildiğinde ‘Grand Naine’ çeşidi için kalluslar orta yoğunlukta, ‘Azman’ çeşidine ait kalluslar ise orta-sert olarak belirlenmiştir. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitleri için kallus rengi ağırlıklı olarak krem kahve olup renk yoğunlukları orta-koyu olarak gözlemlenmiştir. ‘Grand Naine’ için kallus yapısı değerlendirildiğinde BAP+Pikloram içeren (CL-2-1, CL-2-2) ortamlarda pamuksu ve müsilaçlı olarak belirlenirken, yalnız 2,4-D içeren (CL-1-1, CL-1-2, CL-1-3) ortamlarda kompakt-kırılğan yapıda oldukları tespit edilmiştir. ‘Azman’ çeşidi için kallus yapısı CL-1-3 ortamında müsilaçlı olarak belirlenirken, CL-1-1 CL-1-2 CL-2-1 CL-2-2 ortamlarında kompakt-kırılğan yapıda oldukları belirlenmiştir. Kalluslardan elde edilen farklılaşmış yapılar değerlendirildiğinde, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitleri için, 2,4-D içeren ortamlarda embriyojenik yapılar tespit edilirken, BAP + Pikloram içeren (CL-2-1, CL-2-2) ortamlar, tez çalışması boyunca farklılaşma gözlemlenmediği için başarılı bulunmamıştır. Yapılan çalışmada, kalluslar ilk haftadan itibaren gelişim göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlarda, kalluslar ilk haftalarda yumuşak, dağılğan yapıda olup rengi saydam-beyaz iken (Şekil 4.3, Şekil 4.4) ilerleyen zamanlarda ağırlıklı olarak krem-kahve renktedir.

Her altkültür sonunda kallus çoğaltma ve geliştirme yüzdelere ait veriler alınmıştır. Üç altkültür sonunda alınan veriler ile istatistiksel analizler yapılmış, veriler yüzde değer olduğu için açı transformasyonu yapılmıştır. Elde edilen istatistiksel analizler sonucunda kallus geliştirme yüzdesine ilişkin bulgular Çizelge 4.2’de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda ‘Azman’ erkek çiçek eksplantları için en başarılı kallus geliştirme yüzdeleri ortamlara göre, %79,33 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D), %70,17 ile CL-2-2 (0,05 mg/l BAP, 1 mg/l Pikloram), %68,33 CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D), %63,6 CL-1-3 (2.0 mg/l 2,4-D) ve %62,29 CL-2-1 (0,05 mg/l BAP, 0,5 mg/l Pikloram) olarak belirlenmiştir. ‘Grand Naine’ erkek çiçek eksplantlarında, %77,15 ile CL-1-3 (2.0 mg/l 2,4-D), %75,85 ile CL-1-2 (1.0 mg/l),

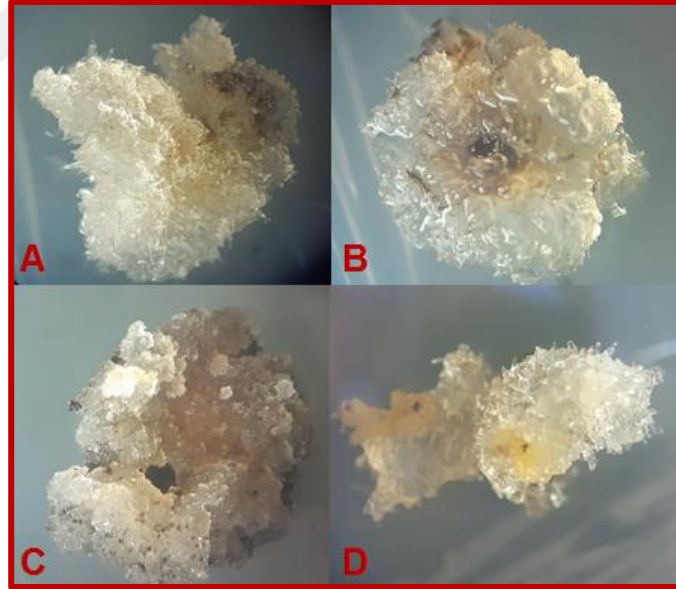
%71,92 CL-2-2 ile (0,05 mg/l BAP, 1 mg/l Pikloram), %66,45 CL-2-1 (0,05 mg/l BAP, 0,5 mg/l Pikloram) ve %64,16 CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D) şeklindedir. Varyans analizi sonuçlarına göre besin ortamı*çesit interaksyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda hiçbir gelişim sağlanmamış ve eksplantların tamamı kurumuştur. Bu sonuç, embriyojenik kallus oluşumunun indüklenmesi için her iki çesit içinde farklı konsantrasyon/kombinasyon oranını içeren bitki büyüme düzenleyicilerinin ortamda varlığının önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.1. ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ Erkek Çiçek Eksplantlarının Kallus Geliştirme Ortamlarında Kalluslara Ait Gözlem Bulguları

Çesit	Ortam	Kallus Büyüme	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Renk Yoğunluğu	Kallus Yapısı	Farklılaşm İş Yapı
Grand Naine	KNT	0	0	0	0	0	0
	CL-1-1	2,6	1,8	2,8	2,2	1,4	3
	CL-1-2	2,8	1,4	2,2	2,2	1,6	3
	CL-1-3	2,8	2,2	2,8	1,8	2	3
	CL-2-1	2,8	2,4	3	2,2	5	0
	CL-2-2	3	1	3	2	6	0
AZMAN	KNT	0	0	0	0	0	0
	CL-1-1	2,4	2,4	2,2	1,4	1,2	3
	CL-1-2	2,8	2	3	2,2	1,8	3
	CL-1-3	1,2	2	3,8	2,4	4,2	3
	CL-2-1	2,2	2	3,8	2,8	1,4	0
	CL-2-2	3	2,6	3,8	2	1,2	0



Şekil 4.3. 'Azman' Erkek Çiçek Eksplantlarında Ortam Denemesinde 2. Haftadan İtibaren Gerçekleşen Kallus Gelişimi A. CL-1-1, B. CL-1-2, C. CL-1-3. 'Grand Naine' Erkek Çiçek Eksplantlarında Farklı Ortamlarda Kallus Gelişimi D. CL-1-1, E. CL-1-2, F. CL-1-3



Şekil 4.4. 'Azman' Erkek Çiçek Eksplantlarının BAP+Pikloram Konsantrasyon/Kombinasyon Ortamlarında Kallus Gelişimi A. CL-2-1, B. CL-2-2, 'Grand Naine' Erkek Çiçek Eksplantlarının BAP+Pikloram Konsantrasyon/Kombinasyon Ortamlarında Kallus Gelişimi C. CL-2-1 D. CL-2-2

Çizelge 4.2. Deneme Desenindeki Ortamların Kallus Oluşturma Yüzdelere Ait Veriler

ÇEŞİT	KNT	CL-1-1	CL-1-2	C-1-3	C-2-1	CL-2-2	ÇEŞİT ORTALAM ASI
AZMAN	0(0)b	68,33 (56,29)a	79,33 (63,50)a	63,60 (53,61)a	62,29 (52,18)a	70,17 (57,32)a	59,25 (48,40)A
GRAND NAİNE	0(0)b	64,16 (53,72)a	75,85 (61,07)a	77,15 (62,06)a	66,45 (55,45)a	71,92 (58,10)a	57,28 (47,15)A
ORTAM ORTALAM ASI	0(0)C	66,24 (55,01)A	77,59 (62,29)A	70,37 (57,83)A	64,37 (53,82)A	71,05 (57,71)A	

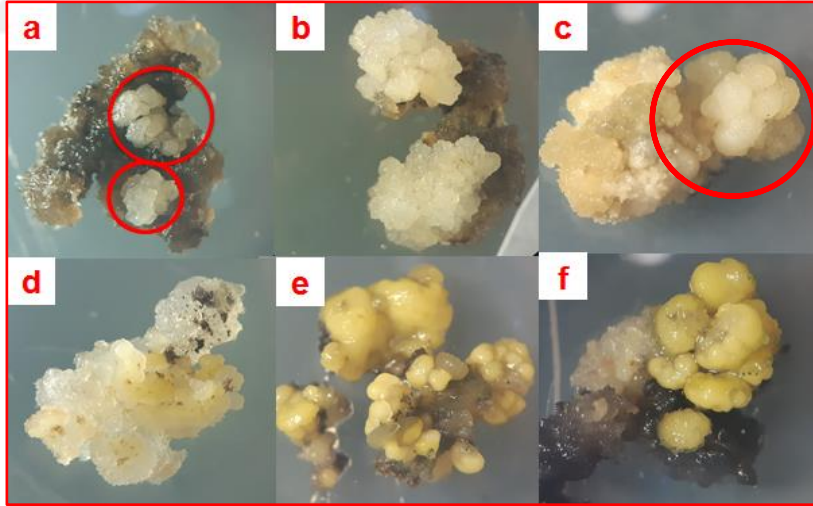
LSD_{ÇEŞİT} : Ö.D.LSD_{ORTAM} : 8,90***LSD_{ORTAM*ÇEŞİT}: Ö.D.

Yapılan çalışmalara ek olarak materyal ve metotta belirtilmiş olan protokolden farklı konsantrasyonlar içeren oksin ve sitokin kombinasyonlu denemeler de yapılmıştır. Bu denemelerde düşük konsantrasyonlu 2,4-D (0,5, 1,0, 2,0 mg/l)'ye oranla 1,0-1,5 mg/l 2,4-D + 0,1-0,3-0,5 mg/l 2İP içeren MS besin ortamlarında daha kısa sürede ve daha fazla kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 2,4-D + 2iP içeren besin ortamlarında 1-2 haftada kallus oluşumu indüklenerek 2,4-D ve BAP+Pikloram konsantrasyon/kombinasyon ortamlarından (3 hafta) daha hızlı kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu ortamlarda embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu da gerçekleşmiştir. Bu nedenle 2,4-D'nin 2İP ile kullanılmasının kallus indüklenmesinde başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

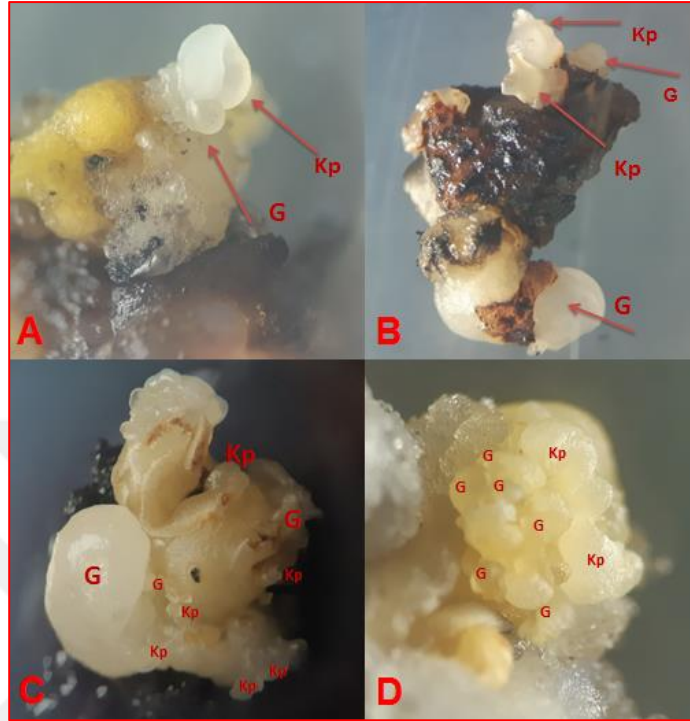
Kallus geliştirme ortamlarında geliştirilen embriyojenik kalluslar, 0,05 mg/l BAP+ 1,0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamında embriyo çoğaltmak amacıyla altkültüre alınmıştır. Söz konusu besin ortamı içerisinde 8 haftalık kültür süresi içerisinde pro-embriyolar ve somatik embriyolar elde edilmeye başlanmıştır. 'Azman' olgunlaşmamış erkek çiçek eksplantlarından elde edilen somatik embriyo yüzdeleri sırasıyla %65 ile CL-1-2 (1,0 mg/l 2,4-D), %40 ile CL-1-3 (2,0 mg/l 2,4-

D) ve %30 ile CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D) şeklindedir. 'Grand Naine' için %62,5 ile CL-1-2 (1,0 mg/l 2,4-D), %50 ile CL-1-3 (2,0 mg/l 2,4-D) ve %42 ile CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D) şeklindedir. Elde edilen embriyojenik yapılar Şekil 4.5'te verilmiştir.

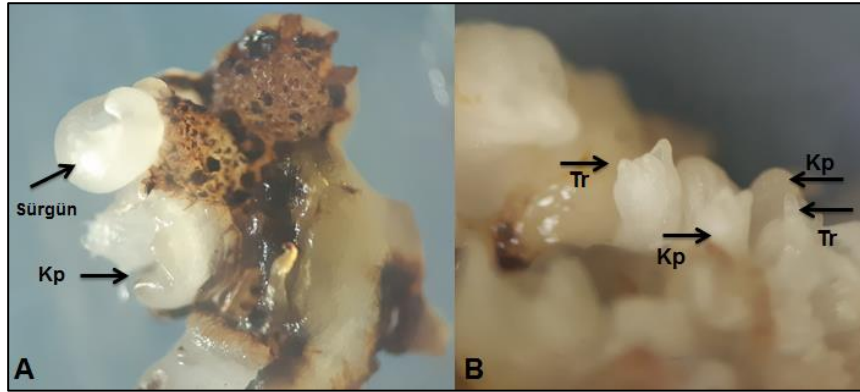
Somatik embriyolar oluşmadan önce koyu kahverengiye dönüşen embriyojenik kallusların, farklılaşarak üzerinde, saydam ve beyaz renkte proembriyonik yapılar şeklinde oluştukları gözlemlenmiştir. Proembriyonik yapılar farklılaşarak 2 hafta içerisinde globular embriyoya dönüşmüşlerdir. Oluşan embriyojenik kallusların yaklaşık 8-12 hafta sonra embriyoya dönüşümü gerçekleşmiştir (Şekil 4.6). Kallus geliştirme ortamlarında gözlemlenen embriyojenik yapılar kısa sürede embriyoya farklılaşmıştır. Somatik embriyo elde edilmesi sırasında embriyojenik kallusların farklılaşması konusunda homojen bir süreç gözlemlenmemiştir. Oluşan pro-embriyoların globular embriyoya farklılaşmalarını düzensiz bir süreç izlemektedir. Söz konusu embriyo oluşumlarına ait görüntüler Şekil 4.7, ve 4.8'de verilmiştir



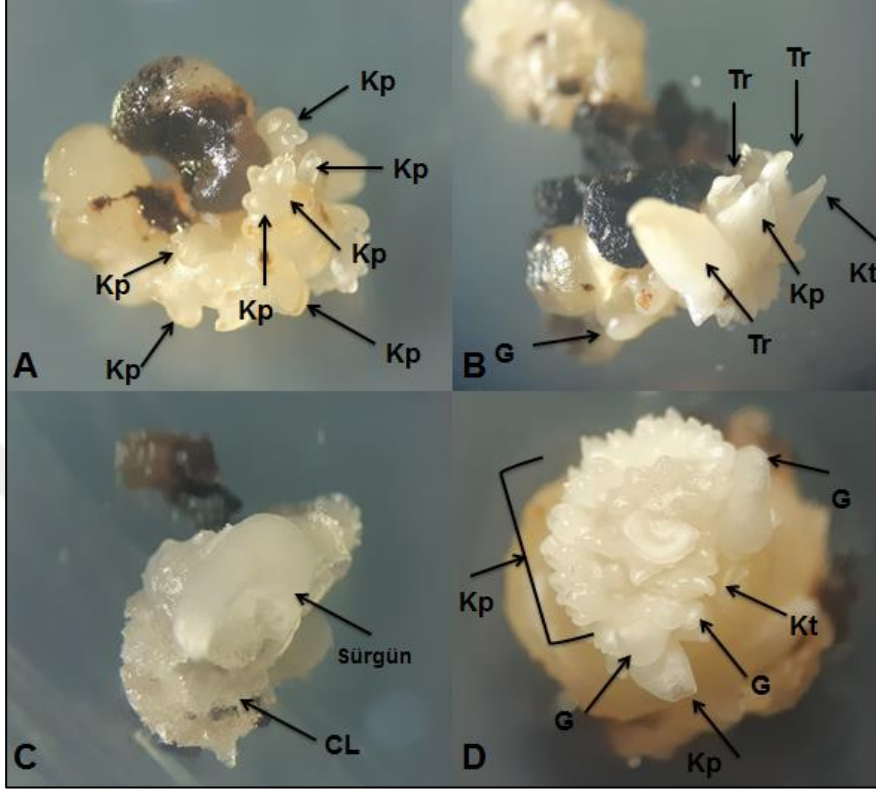
Şekil 4.5. Erkek Çiçek Eksplantlarına Ait Embriyojenik Kallus Görüntüleri A.B. 'Azman'; Yarı Saydam, Dağılgan Embriyojenik Kallus, C. 'Grand Naine'; Krem Renkli Kompakt Embriyojenik Kallus, D. 'Grand Naine'; Beyaz ve Krem Renkli, Kompakt Embriyojenik Kallus, E.F. 'Azman'; Müsilajlı Soluk Sarı Embriyojenik Kallus



Şekil 4.6. 'Grand Naine' Çeşidinde 10. Hafta'nın Sonunda Meydana Gelen Yapılar, A) Globular (G) ve Kalp (Kp) Aşamaları, B) Kp ve G Aşamaları, C) Kp ve G Aşamaları, D) G ve Kp Aşamaları



Şekil 4.7. 'Grand Naine' Çeşidinde 20. Hafta'nın Sonunda Meydana Gelen Yapılar A. Sürgün Oluşumu, Kalp Aşaması (Kp), B. Torpedo (Tr), Kalp (Kp) Aşamaları



Şekil 4.8. 'Azman' Çeşidinde 16. Hafta Sonunda Meydana Gelen Yapılar, A. Kalp (Kp) Aşaması, B. Embrioların Kalp (Kp), Torpedo (Tr), Kotiledon (Kt) Globular (G) Aşamaları, C. Kallus (CL) Üzerinde Sürgün Oluşumu, D. Kp, Kt, G Aşamaları

4.1.2. Somatik Embriyogenesis Yöntemi ile Elde Edilen Bitkilere Ait Bulgular

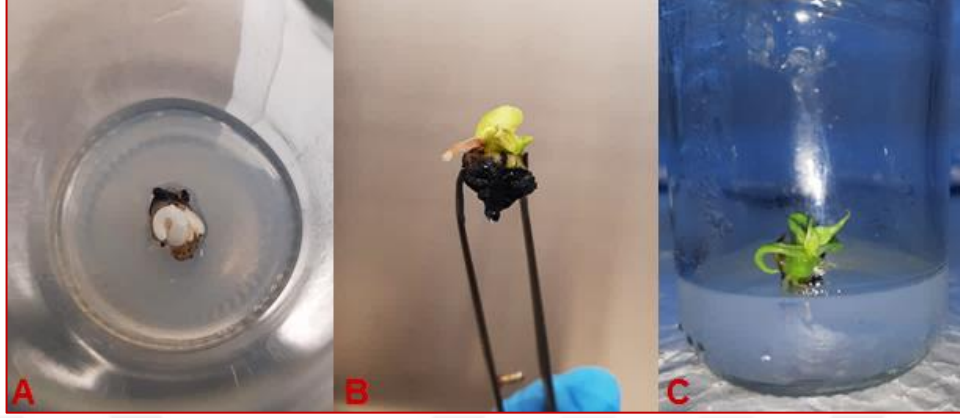
'Azman' ve 'Grand Naine' çeşitlerine ait somatik embriyolar çimlendirilmek üzere hormon içermeyen MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen bitkiler (Şekil 4.9) (Şekil 4.10) dış koşullara aktarılmaya uygun büyüklüğe ulaşına kadar, 4 haftada bir olacak şekilde hormonsuz MS ortamında indüklenmeye devam edilmiştir. Gelişen bitkiciklerin 2. altkültür öncesi görüntüleri Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir. Üç altkültür sonunda (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14), gelişen bitkilerde; kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm), yaprak sayısı (adet), bitki boyu (cm) ve yalancı gövde uzunluğu (cm) parametrelerine ait veriler alındıktan

sonra aklimatizasyon işlemine geçilmiştir (Şekil 4.15). Bitkilerin aklimatizasyon öncesi görüntüleri Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.

Seraya aktarılan bitkilerin yaşama oranı, ‘Azman’ çeşidi için %87,5, ‘Grand Naine’ çeşidi için ise %85’tir. Dış ortama aktarılan bitkilere ait görüntüler Şekil 4.18 de verilmiştir. Tez çalışmasında yapılan işlemlerin tamamını temsil eden şema Şekil 4.19’de verilmiştir. Analiz sonucunda 2 farklı (CL-1-2, CL-1-3) ortamdan elde edilen ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerinin incelenen parametrelerine istatistiksel analiz uygulanmıştır. ‘Azman’ çeşidine ait bitkiler sadece CL-1-3 besin ortamından ‘Grand Naine’ çeşidine ait bitkiler ise CL-1-2 besin ortamından elde edildiği için istatistiksel analiz yapılırken ‘Azman’ çeşidi için CL-1-3 ortamındaki verilere 0, ‘Grand Naine’ çeşidi için CL-1-2 ortam verilerine 0 girilmiştir.



Şekil 4.9. ‘Grand Naine’ CL-1-3 (1.5 mg/l 2,4-D) MS Besin Ortamında Gelişen Kalluslardan 0,05 mg/l BAP + 1 mg/l Pikloram MS Besin Ortamında Elde Edilen Somatik Embriyoların 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA MS Besin Ortamında Geliştirildikten Sonra Hormonsuz MS Ortamında Çimlendirilmesine Ait Görüntüler



Şekil 4.10. 'Azman' Çeşidine Ait Eksplantlarda CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) Ortamında Gelişen Kalluslardan 0,05 mg/l BAP + 1 mg/l Pikloram İçeren MS Besin Ortamında Elde Edilen Somatik Embriyoların 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA İçeren MS Besin Ortamında Geliştirildikten Sonra Çimlendirilmesine Ait Görüntüler, A. Sürgün Oluşturan Embriyonun Hormonsuz MS Ortamına Alınması B. Çimlenmiş Bitkiciklerde Kotiledon Yaprakların Oluşması ve Kök Oluşumu C. Kök ve Sürgün Oluşturmuş 'Azman' Bitkiciği



Şekil 4.11. 'Grand Naine' Çeşidi, Hormonsuz MS Ortamında Gelişen Bitkiciklerin 4 Hafta Sonra 2. Altkültüre Alınması Sırasındaki Görüntüler



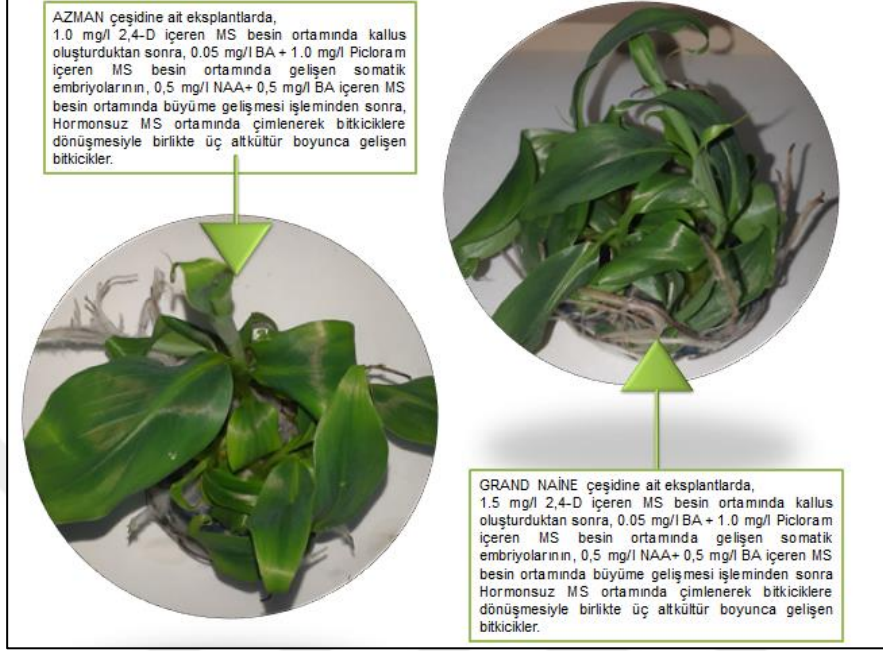
Şekil 4.12. 'Azman' Çeşidi, Hormonsuz MS Ortamında Gelişen Bitkiciklerin 4 Hafta Sonra 2. Altkültüre Alınması Öncesi Görüntüleri



Şekil 4.13. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Bitkiciklerin Hormonsuz MS Besin Ortamında 3. Altkültüre Alınması İşlemine Ait Görüntüler



Şekil 4.14. 'Azman' Çeşidine Ait Bitkiciklerin Hormonsuz MS Ortamında 3. Altkültüre Alınması İşlemine Ait Görüntüler



Şekil 4.15. 'Azman' ve 'Grand Naine' Bitkilerinin 3. Alt kültür Sonunda Besin Ortamından Çıkarılmasına Ait Görseller



Şekil 4.16. Üç Alt kültür Boyunca Hormonsuz MS Besin Ortamında Kök ve Sür günleri Gelişen 'Grand Naine' Çeşidine Ait Bitkiciklerin Aklimatizasyon Öncesi Görüntüleri



Şekil 4.17. Üç Altkültür Boyunca Hormonsuz MS Besin Ortamında Kök ve Sürgünleri Gelişen 'Azman' Çeşidine Ait Bitkiciklerin Aklimatizasyon Öncesi Görüntüleri



Şekil 4.18. 'Grand Naine' ve 'Azman' Çeşidine Ait Bitkilerin Aklimatizasyon Sonrası Görüntüleri, A. 'Azman' Çeşidine Ait Bitkiler, B. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Bitkiler C. 'Azman' Çeşidine Ait Bitkiler D. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Bikiler



Şekil 4.19. F.1. Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuğu, F.2. Olgunlaşmamış Erkek Çiçek Tomurcuklarının Kütüreye Alınması, F.3. Kütüreye Alınan Eksplantlarda Kallus Oluşması, F.4. Eksplantların Somatik Embriyo Oluşturması, F.5. Somatik Embriyoların Bitkiye Farklılaşması, F.6. Bitkiciklerin Büyümesi, F.7. Aklimatizasyon Sonrası Muz Bitkileri (F: Fotoğraf) (F1: En Küçük Fotoğraf)

4.1.2.1 Kök Sayısına Ait Bulgular

'Grand Naine' ve 'Azman' çeşitlerinden elde edilen somatik embriyoların hormonsuz MS ortamında çimlenmeleri ardından oluşan bitkilerin kök sayısına ait istatistiksel verileri çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde çeşit ve ortamlar arasında istatistiksel açıdan fark görülmemiş olup en fazla kök sayısının 18,32 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D) ortamındaki 'Azman' çeşidine ait olduğu tespit edilmiştir. Çeşit*ortam etkileşimi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Kök Sayısına (Adet) Ait Veriler

KÖK SAYISI (Adet)			
Çeşit	CL 1-2	CL 1-3	Çeşit Ortalaması
'Azman'	18,32a	0b	9,16A
'Grand Naine'	0b	16,91a	8,45A
Ortam Ortalaması	9,16A	8,45A	

LSD_{ÇEŞİT} : Ö.D.
LSD_{ORTAM} : Ö.D.
LSD_{ORTAM*ÇEŞİT} : 4,36***

4.1.2.2 Ortalama Kök Uzunluğuna Ait Bulgular

Veriler incelendiğinde kök uzunluğu için çeşit ve ortam etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Araştırmada kullanılan çeşitlerin kök uzunluğuna ait verileri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Ortam ile ilgili verileri inceleyecek olursak CL-1-3 besin ortamının kök uzunluğu 5,29 cm ile CL-1-2 (3,33 cm) ortamına göre istatistiksel olarak daha fazla olarak tespit edilmiştir. Çeşit ortalaması verilerine göre en iyi çeşit 5,29 cm kök uzunluğu ile 'Grand Naine'dir. Çeşit*ortam interaksiyonuna bakıldığında, CL-1-3 ortamındaki 'Grand Naine' bitkilerinin kök uzunluğu 10,59 cm ile CL-1-2 ortamındaki 6,66 cm kök uzunluğuna sahip olan 'Azman' çeşidinden daha fazladır.

Çizelge 4.4. Kök Uzunluğuna (cm) Ait Veriler

KÖK UZUNLUĞU (cm)			
Çeşit	CL 1-2	CL 1-3	Çeşit Ortalaması
'Azman'	6,66b	0c	3,33B
'Grand Naine'	0c	10,59b	5,29A
Ortam Ortalaması	3,33B	5,29A	

LSD_{ÇEŞİT} : 1,038**LSD_{ORTAM} : 1,038**LSD_{ORTAM*ÇEŞİT} : 1,46***

4.1.2.3. Dış Koşullardaki Bitkilerin Yaprak Sayısına Ait Bulgular

Yaprak sayısına ait verilerin istatistiki analizi bulgularına bakıldığında ortam, çeşit ve çeşit*ortam interaksyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin oluşturduğu yaprak sayısına ait veriler Çizelge 4.5'te verilmiştir. Azman çeşidi 1,43 ile Grand Naine çeşidinden daha fazla yaprak oluşturmuştur. En fazla yaprak sayısı 8.08 ile CL-1-3 ortamındaki 'Grand Naine' çeşidine aittir. Ortam ortalaması açısından ise CL-1-3 (4.04), CL-1-2 (2.87)'den daha başarılı sonuç vermiştir.

Çizelge 4.5.Yaprak Sayısına (Adet) Ait Veriler

YAPRAK SAYISI (Adet)			
Çeşit	CL 1-2	CL 1-3	Çeşit Ortalaması
'Azman'	2,87b	0c	1,43B
'Grand Naine'	0c	8,08a	4,04A
Ortam Ortalaması	1,43B	4,04A	

LSD_{ÇEŞİT} : 0.26***LSD_{ORTAM} : 0.26***LSD_{ORTAM*ÇEŞİT} : 0.36***

4.1.2.4. Bitki Boyuna Ait Bulgular

Bitki boyuna ait verilerin istatistiksel analizi bulgularına bakıldığında ortam, çeşit ve çeşit*ortam interaksyonunu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Tez çalışmasında kullanılan 'Azman' ve 'Grand Naine' çeşitlerinden somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerin boylarına ait veriler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Genotip bakımından değerlendirildiğinde 'Azman' çeşidi 3,58cm ile 'Grand Naine' (1.48cm) çeşidinden daha uzun bitkiler oluşturmuştur. Ortam*çeşit interaksyonunu incelendiğinde en yüksek bitki boyunun CL-1-2'de 7,17 cm ile 'Azman' çeşidine ait olduğu görülmektedir. Ortam verilerine göre CL-1-2 ortamı 3,58 cm ortalama ile CL-1-3'ten (1,48 cm) daha başarılıdır.

Çizelge 4.6. Bitki Boyuna (cm) Ait Veriler

BİTKİ BOYU (cm)			
Genotip	CL 1-2	CL 1-3	Genotip Ortalaması
'Azman'	7,17a	0c	3,58A
'Grand Naine'	0c	2,97b	1,48B
Ortam Ortalaması	3,58A	1,48B	

LSD_{ÇEŞİT} : 0.26***
LSD_{ORTAM} : 0.26***
LSD_{ORTAM*ÇEŞİT} : 0.37***

4.1.2.5. Yalancı Gövde Uzunluğuna Ait Bulgular

Yalancı gövde oluşturan muz bitkileri için, bitki boyu ile ilgili yapraklarla birlikte olacak şekilde bitkinin tamamının ölçülmesi ile elde edilen verilere ait bulgular ise çizelge 4.7'de verilmiştir. Veriler incelendiğinde çeşit, ortam ve çeşit*ortam interaksyonunu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Elde edilen bitkilerin boylarının tamamına ait verilere bakıldığında Genotip açısından 'Azman' çeşidinin bitkileri 6,33 cm ile 'Grand Naine'dan daha uzundur. Bitki boyu açısından ortam verilerine bakıldığında CL-1-2 ortamı 6,33 cm ile daha başarılı sonuç vermiştir. Ortam*çeşit interaksyonunda 12,66 cm ile CL-1-2 ortamından elde edilen 'Azman' bitkilerinin boyu istatistiki açıdan daha önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Yalancı Gövde Uzunluğuna (cm) Ait Veriler

YALANCI GÖVDE UZUNLUĞU (cm)			
Çeşit	CL 1-2	CL 1-3	Çeşit Ortalaması
Azman	12,66a	0c	6,33A
Grand Naine	0c	7,82b	3,91B
Ortam Ortalaması	6,33A	3,91B	

LSD_{ÇEŞİT} : 2,34**LSD_{ORTAM} : 2,34**LSD_{ORTAM*ÇEŞİT} : 3,31***

4.1.2.6. Yaprak Klorofil Miktarına Ait Bulgular

Aklimatizasyondan hemen sonra ve serada gelişimine devam eden bitkilerin yapraklarından farklı zamanlarda olacak şekilde toplamda 4 defa ölçüm alınmıştır. Ölçüm sırasında taşınabilir klorofilmetre (SPAD-502) kullanılmıştır. Ölçümlerden elde edilen verilerin değerlendirilmek üzere ortalamaları alınmıştır. Ölçümlere ait bulgular çizelge 4.8’de verilmiştir. Ölçümlerden elde edilen ortalamalar sonucunda 51.99 cci ile ‘Grand Naine’ çeşidine ait bitkilerin 50.74 cci ortalamaya sahip olan ‘Azman’ çeşidine ait bitkilerden daha fazla klorofil miktarına sahip olduğu saptanmıştır. Sera ortamında aynı koşullar altında muhafaza edilen bitkilerdeki farklılığın sebebi çeşit farklılığından kaynaklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8. Klorofil Miktarına Ait Bulgular

Klorofil Miktarına Ait Bulgular (cci)		
Genotip	Ortam	Klorofil Miktarı(cci)
Azman	CL-1-2	50.74
Grand Naine	CL-1-3	51,99

4.1.3. Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular

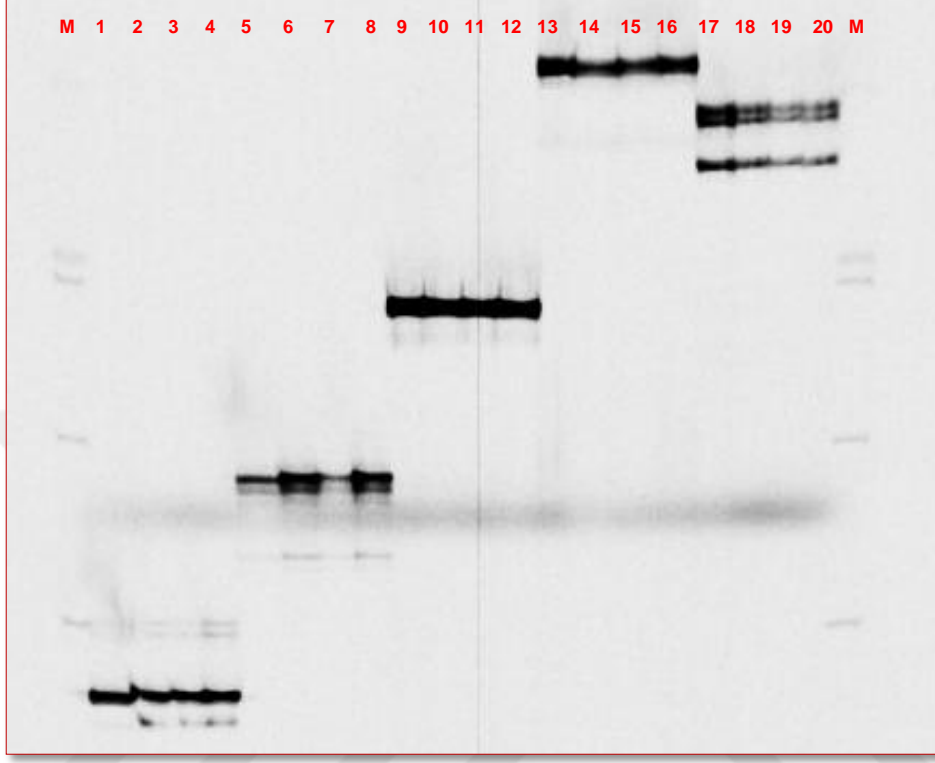
Tez çalışması sonucunda, ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları eksplantlarından somatik embriyolardan bitkicikler elde edildikten sonra, örnekler bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamında 3 kere altkültüre alınmıştır. Yeterli büyüklüğe ulaşan bitkilerin dış koşullara alıştırılması işlemi başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır. Çalışmada indirekt somatik embriyogenesis yöntemiyle elde edilen bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığının tespiti başlangıç materyali ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu sağlamak amacıyla uygun bir protokolün geliştirilebilmesi için elde edilen bitkilerin başlangıç materyali ile genetik olarak farklı olmaması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitlerinin olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarından elde edilen bitkilerde genetik açılımın olup olmadığı, SSR markır sistemine ait primerler kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla toplam 12 SSR primeri kullanılmıştır. SSR analizlerinde, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait giriş materyali olarak kullanılan ana bitkilerden birer ve somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerden birer örnek olmak üzere toplam 4 örnek kullanılmıştır. SSR analizlerinde kullanılan örneklerin DNA kalite ve miktarına ait bilgiler Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Kullanılan bu SSR primerleri polimorfik sonuç veren primerler arasından seçilmiştir.

Çizelge 4.9. DNA Kalite ve Miktarlarına Ait Sonuçlar

Örnek No	Örnek Adı	ng/ul	260/280
1	'Azman' Ana Bitki	1255,9	1,74
2	'Azman' Somatik Embriyodan Gelişen Bitki	372,13	2,03
3	'Grand Naine' Ana Bitki	250.96	2,17
4	'Grand Naine' Somatik Embriyodan Gelişen Bitki	405,34	1,97

Çalışmada PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra tez çalışmasında kullanılan 'Grand Naine' ve 'Azman' çeşitlerinin olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarının kullanılarak somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu denemelerine ait bitkisel materyallerden alınan DNA örnekleri ile SSR analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu primerlerin polimorfik sonuçlar vermesi nedeniyle bu çalışma sonucunda elde edilen monomorfik DNA bant profilleri bu bitkilerin genetik olarak sabit olduğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak, bu bitkilerle başlangıç materyali arasında genetik olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlara ait jel görüntüsü Şekil 4.20'de verilmiştir.



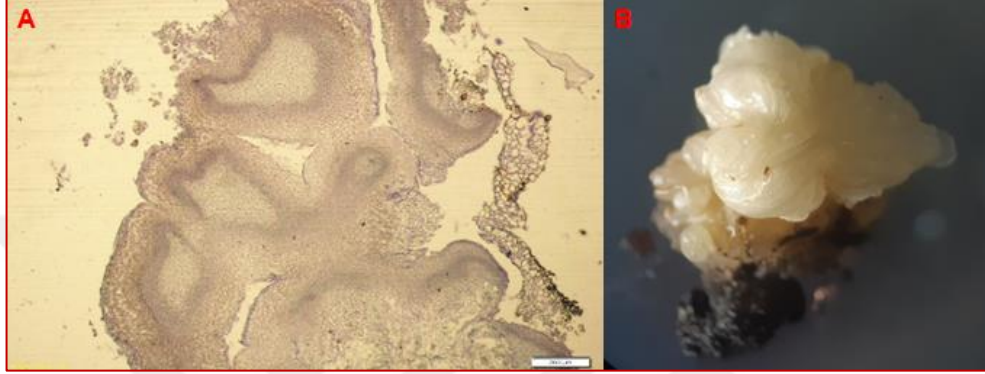
Şekil 4.20. 1-4 MA 1-17 No'lu Primer, 5-8 AGMI 93-94, 9-12 AGMI 103-103, 13-16 MAOCEN 03, 17-20 MAOCEN 12 No'lu Primerlere Ait Poliakrilamid Jel Görüntüsü

4.1.4. 'Grand Naine' ve 'Azman' Histolojik Analiz Bulguları

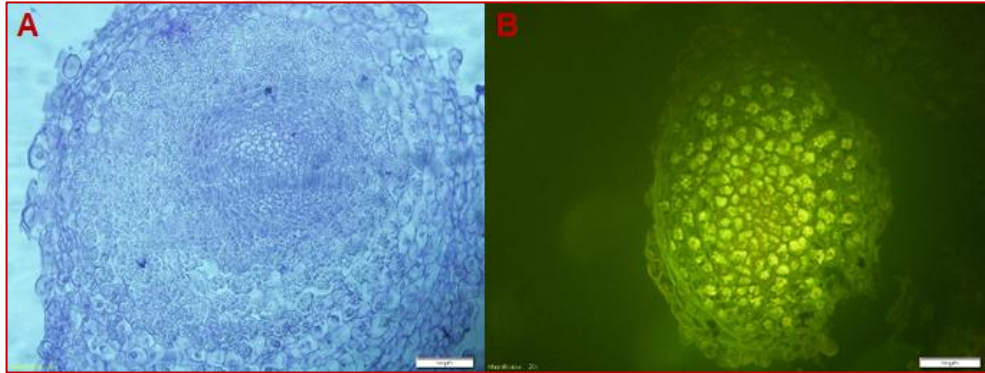
4.1.4.1. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Histolojik Bulgular

'Grand Naine' çeşidine ait 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamındaki örnekte, hem globular hem de ileri safhada embriyolar görülmüştür (Şekil 4.21). Bu örnekte globular embriyoların (Şekil 4.22) diğer embriyolara oranla daha az görüldüğü ve genelde ileri safha embriyoların olduğu gözlemlenmiştir. Embriyo olarak tabir edilen hücrelerde yoğun nişasta birikimi de tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Bu konuda yapılmış olan literatür taramaları sonucunda muzda embriyo gelişimi sırasında hücrelerde nişasta birikiminin olduğu belirlenmiştir.

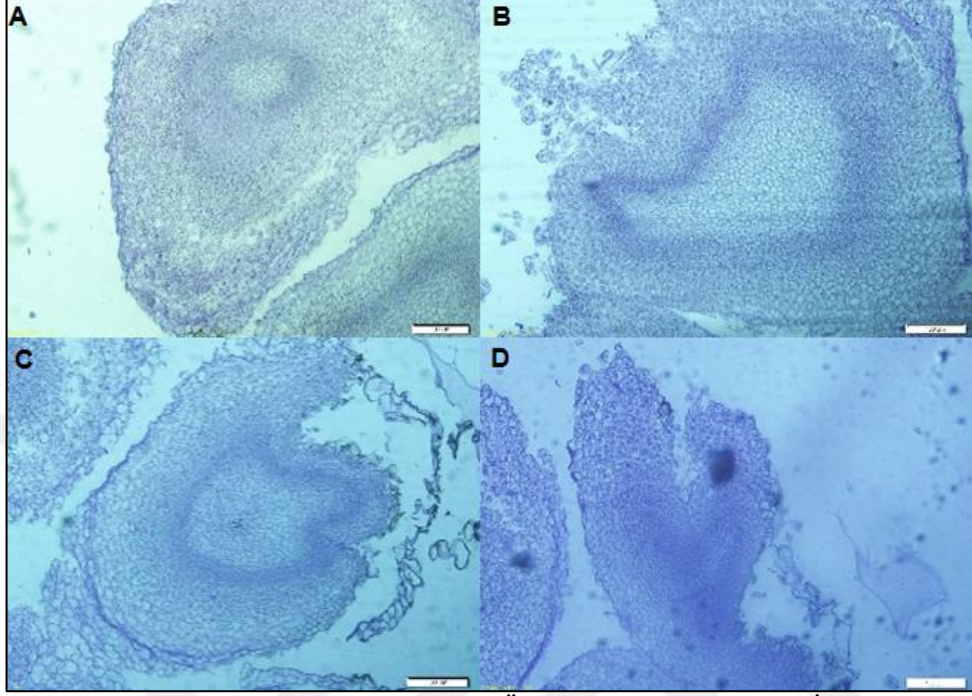
İleri safhalara ait embriyolarda Şekil 4.23'te sunulmuştur. Oluşan kallus üzerinde şekilde de izlenebileceği üzere globular safhanın uzamış haldeki oblong yapılı embriyo ve kalp, torpedo, kotiledon yapılı embriyolar bulunmaktadır.



Şekil 4.21. A. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Örnekte Oluşan Farklı Safhalardaki Embriyoların Birlikte Görünümü, B. Analiz İçin Verilen Örneğe Ait Fotoğraf

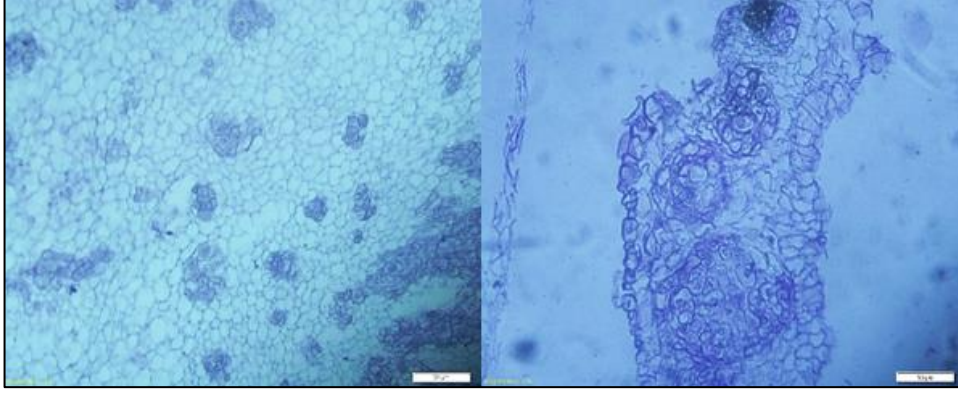


Şekil 4.22. A. Gelişmekte Olan Globular Embriyoların Işık Mikroskopundaki Görüntüsü, B. Gelişmekte Olan Embriyolara Ait Hücrelerdeki Yoğun Nişasta Birikimi

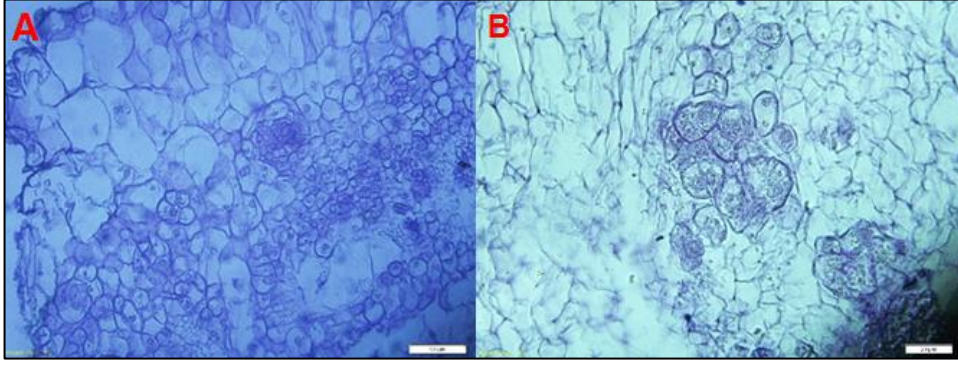


Şekil 4.23. ‘Grand Naine’ Çeşidine Ait Örnekte Gelişmekte Olan İleri Safhadaki Embriyolar; A. Oblong, B. Yürek, C. Torpedo, D. Kotiledon

‘Grand Naine’ çeşidine ait 1,5 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamındaki kallusta pro-embriyolar oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.24). Yapılan seri kesit incelemeleri sonucunda oluşan pro-embriyoların 32-64 hücreli oldukları ve hücre bölünmelerinin de yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.25). Çok az olmakla birlikte bazı kısımlarda hücrelerde dejenerasyon olduğu ve bu hücrelerin de boyanmamış hücreler olduğu gözlenmiştir. Bu durum çok yoğun olmadığı için kallustaki sarı yapının gelişmekte olan embriyoların renk değiştirmesini gösteriyor olduğu düşünülmektedir. Literatürde kalluslarda farklı dönemlerde farklı renkler oluşabildiği de belirtilmiştir. Embriyo elde etmek amacıyla belirlenmiş olan 0,05 mg/l BAP+ 1,0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamına alınması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bahsi geçen oluşumlarda farklı ortama alındıktan sonra embriyo gelişme sürecine devam edecektir.

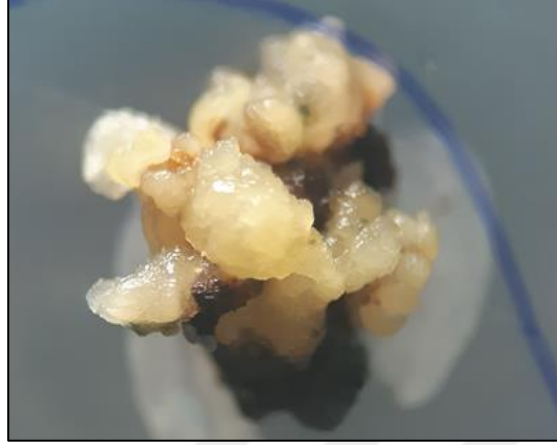


Şekil 4.24. Pro-Embrioların Oluşumu

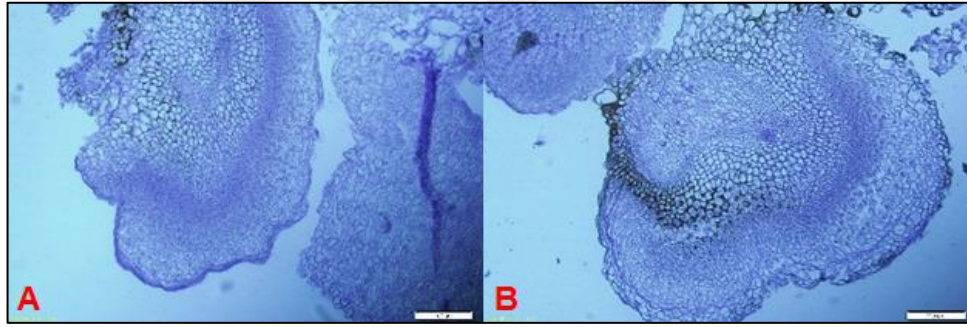


Şekil 4.25. Gelişmekte Olan Pro-Embriolar. A. 32-64 Hücreli Bir Pro-Embriyo, B. Proembriyo Oluşumu Sırasındaki Hücre Bölünmeleri ve Nişasta Biriktirmiş Hücreler

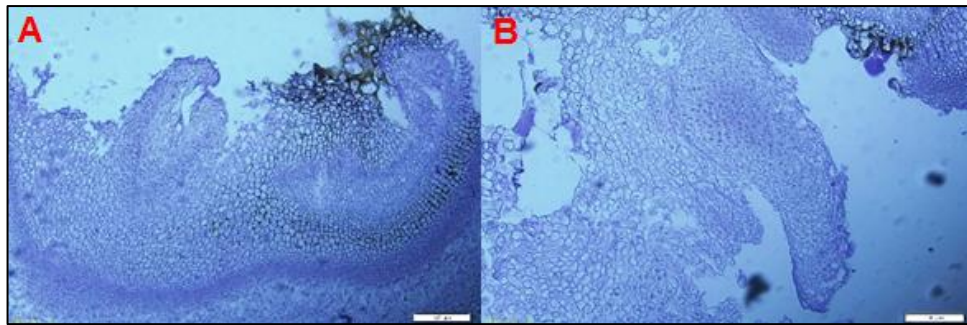
'Grand Naine' 1,5 mg/l 2,4-D ortamında gelişen kallusların embriyo oluşturması amacıyla 0,05 mg/l BAP+ 1.0 mg/l Pikloram ortamına alınmış örnekte (Şekil 4.26), çok iri embriyoların yanında yeni oluşmaya başlayan embriyoların da olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan embriyolardaki hücrelerin çoğunda nişasta birikimi olduğu da görülmüştür (Şekil 4.27). Uzun yapılı kotiledon safhasının ileri aşamalarına benzer yapılar da görülmüş olup bu yapılar içerisindeki iletim demetleri de izlenmiştir (Şekil 4.27/28). Bunun yanında uzamış armut şekilli olan safhaya da rastlanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.26. 'Grand Naine' Çeşidine Ait Eksplantların 1.5 mg/l 2,4-D İçeren MS Besin Ortamında Gelişen Kalluslarının 0,05 Mg/l BAP ve 1.0 mg/l Pikloram İçeren MS Besin Ortamında Oluşturduğu Embriyolar ve Safhalarının Belirlenmesi Amacıyla Seçilmiş Örnek



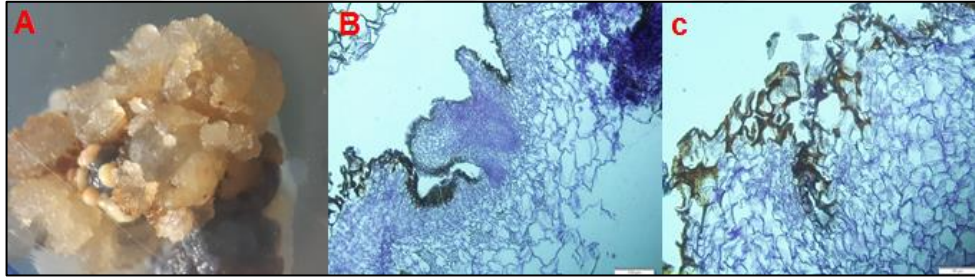
Şekil 4.27. Gelişen Embriyolar. A. Globular Sonrası Oblong Safha, B. Kalp Safhası



Şekil 4.28. A. Kotiledon Safhası ile Kotiledon'un İleri Safhaları B. Uzamış Armut Şeklindeki Embriyolar

4.1.4.2 ‘Azman’ Çeşidine Ait Histolojik Bulgular

‘Azman’ çeşidine ait erkek çiçek eksplantlarının, 1,0 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında kallus gelişiminden sonra, embriyo oluşturması amacıyla 0,05 mg/l BAP ve 1,0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamındaki kallusların uç kısımlarında hücre bozulmalarını gösteren yapılar rastlanmıştır (Şekil 4.29). Bazı yerlerde embriyo gelişiminin başladığı, bu embriyolara ait hücreler içerisinde nişasta birikiminin de olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu tip dokularda da bozulmaların başladığı görülmüştür (Şekil 4.29). Örnekteki oluşumlar ve deformasyonlar diğer örnekler ile karşılaştırıldığında bozulma sebebinin enfeksiyon olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.29. A. İncelenen Örneğe Ait Görsel B. Gelişmekte Olan Embriyoda Başlayan Hücre Dejenerasyonu C. Hücrelerde Meydana Gelen Deformasyon

4.2. Tartışma

Tez çalışmasına ait yüzey sterilizasyonu, kallus oluşturma, kallus geliştirme ortamı, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu ortamları, genetik kararlılığın belirlenmesi ile ilgili moleküler çalışmalar, somatik embriyoların varlığını saptamak ve doğrulamak amacıyla histolojik çalışmalar ve elde edilen somatik embriyolardan gelişen bitkilerin aklimatizasyonu ile ilgili tüm bulgular yukarıda sunulmuştur. Çalışmada yüzey sterilizasyonunda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiş ve bu aşamada kayıp yaşanmamıştır. Farklı araştırmacılar yüzey sterilizasyonu aşamasında farklı sterilant maddeler kullanmışlardır. Literatür ile kıyasladığımızda örneğin Remakanthan ve ark (2013), 'Grand Naine' çeşitinde somatik embriyogenesis çalışmaları yürütmüşler ve kontaminasyon problemini aşmak için HgCl₂ (%0,1) kullanmışlardır. Belirlediğimiz protokol sonucu herhangi bir kayıp yaşanmadığı için böylesi ağır bir sterilant kullanılmaya gerek duyulmamıştır.

Tez çalışması kapsamında kallus geliştirme ortamı değerlendirildiğinde, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve farklı konsantrasyonlarda BAP ve Pikloram kombinasyonları ile çalışan Remakanthan ve ark (2013), 'Grand Naine' çeşitinde test ettikleri 36 farklı Pikloram ve BAP içeren ortamlardan 19 ortamda embriyojenik yapılar elde etmişlerdir. Somatik embriyo elde etme sürecinde BAP ve Pikloram kombinasyonlarının önemli etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Fakat bu çalışmada BAP ve Pikloram konsantrasyon/kombinasyonlarını içeren denemelerde kallus gelişimi sağlanmadığı için embriyojenik yapı ve embriyo oluşumu gerçekleşmemiştir. Aynı bitki büyüme düzenleyicilerle çalışılan 0,05 mg/l BAP + 0,5 mg/l Pikloram (CL-2-1) ve BAP 0,05 mg/l+ Pikloram 1,0 mg/l (CL-2-2) ortamlarında müsilaçlı yapıda kalluslar elde edilmiştir. Oluşan yapının büyümeyi baskıladığı, embriyoya ve dolayısıyla bitkiye dönüşümüne olanak vermediği için BAP+Pikloram denemelerinde tez çalışması boyunca başarılı bir sonuca ulaşamamıştır. Ancak çalışmalarında en başarılı somatik embriyo oluşturma ortamı (0,05 mg/l BAP + 1,0 mg/l Pikloram), tez çalışmasında gelişip çoğalan,

embriyojenik yapılar oluşturmuş kallusların gelişmesi ve somatik embriyo elde etme ortamı için kullanılmıştır. Kaliteli embriyo elde etmek için BAP varlığının önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sadece 2,4-D'nin kullanıldığı konsantrasyon denemelerinde ise somatik embriyo oluşumunu en fazla %83,33 ile 0.1 mg/l 2,4-D kullanılan ortamda elde etmişlerdir. Çalışmalarında 1,0-2,0 mg/l 2,4-D kullandıkları ortamların ikisinde de %58.33 oranda başarı elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise 'Azman' çeşidi için %79,33 ile 1.0 mg/l 2,4-D, 'Grand Naine' çeşidi için %77,15 ile 2.0 mg/l 2,4-D başarılı bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde başarıyı etkileyen faktörün Remakanthan ve ark (2013)'nın eksplant kaynağı olarak çoklu meristem kültürü ile sürgünlerin apikal meristemlerini kullanmalarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Somatik embriyoların oluşum yüzdeleri bulguları değerlendirildiğinde, 'Azman' çeşidi için sırasıyla %65 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D), %40 ile CL-1-3 (2.0 mg/l 2,4-D) ve %30 ile CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D) şeklindedir. 'Grand Naine' çeşidine ait eksplantlarının somatik embriyo yüzdeleri ise %62.5 ile CL-1-2 (1.0 mg/l 2,4-D), %50 ile CL-1-3 (2.0 mg/l 2,4-D) ve %42 ile CL-1-1 (0,5 mg/l 2,4-D) şeklindedir. Pikloram ve BAP konsantrasyon ve kombinasyon denemelerinde kalluslarda gelişme olmamasına rağmen, 2,4-D içeren besin ortamlarında gelişen kallusların, 0,05 mg/l BAP ve 1.0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamına alınmasının ardından bu yapıların embriyojenik yapılara farklılaşması, proembriyolar oluşturması ve globular embriyoya dönüşüm oranları daha hızlı olmuştur.

Uma ve ark (2012), *Musa acuminata* ssp. *Burmannica*'nın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış zigotik embriyolarında somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu sağlamak amacıyla 2,4-D ve Pikloramın farklı konsantrasyonlarını denemişler ve en yüksek çoğalma yüzdesini %93 ile 1.0 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş ortam denemelerinde elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da benzer olarak 2,4-D'nin 1.0 – 2.0 mg/l konsantrasyonları başarılı bulunmuştur. Ancak başarı oranlarının farklı olmasının kullanılan çeşit ve eksplant tipinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ali ve ark (2013), 'Grand Naine' çeşidinde

olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcukları kullanarak somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda (0,5-1.0 mg/l) kullanılan 2,4-D'nin embriyojenik kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında ise 0,5 mg/l 2,4-D içeren ortamda kallus gelişiminin ve embriyo oluşumunun en düşük düzeyde olması ve bitki elde edilmemesi nedeniyle farklı sonuç elde edilmiştir.

Embriyo geliştirmek için, somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu sağlanan çalışmalarda kullanılan literatürlerden yola çıkılarak belirlenen 0,5 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren MS besin ortamında indüklenen embriyolarda kontaminasyon sorunu oluşmuştur. Fakat konu ile ilgili literatürler incelendiğinde örneğin, Remakanthan ve ark, (2013), somatik embriyoların çoğalması için BAP, BAP+Pikloram, BAP ve NAA kombinasyonlarını denemiş ve bir sorun bildirmemişlerdir. Kontamine olmayan embriyoların bitkiye dönüşmesi ve bitkilerin gelişme süreci daha hızlı olmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen embriyolarda kayıp yaşamamak amacıyla embriyojenik kallus geliştirme ve somatik embriyo elde etme ortamında muameleye devam edilmiş gelişen somatik embriyolar hormon içermeyen MS besin ortamında çimlenerek kök ve sürgün oluşturmuşlardır. Tez çalışmasının sürecini özetleyen görsel Şekil 4.21'de verilmiştir.

In vitro koşullarda yapılan çalışmalarda uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin türü ve konsantrasyonu, eksplantın genetik yapısı, alt kültür sayısı ve yapılan alt kültürlerin süresi, somatik embriyolardan rejenere edilen bitkilerin özelliklerini etkileyebilir (Koniczny ve ark, 2012). Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular diğer araştırmacıların bulgularından farklılık gösterebilir.

Genetik kararlılık ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde; 'Grand Naine' ve Tropical çeşitlerinde Somatik Embriyogenesis yöntemi ve hücre süspansiyonu kullanarak elde ettikleri bitkilerde 11 SSR markırı kullanan Morais-Lino ve ark

(2008), yapmış oldukları moleküler çalışmalar sonucunda somaklonal varyasyon tespit etmemişlerdir.

Natarajhan ve ark (2019), *Musa laterita*, *Musa beccarii* ve *Musa velutina* olmak üzere üç süs muzunun, olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuklarında somatik embriyogenesis yöntemi kullanarak bitki rejenerasyonu üzerine çalışmışlardır. Yapmış oldukları çalışmanın sonunda genetik kararlılığı tespit etmek amacıyla SRAP markır sisteminden yararlanmışlar ve bir dizi monomorfik bant elde etmişlerdir. Kullandıkları üç çeşitte de çalışmaları sonucunda elde ettikleri bitkiler ile başlangıç materyali arasında farklılık gözlemlenmemişlerdir. Tez çalışması kapsamında SSR markırları ile yapılan DNA analizleri sonucunda somatik embriyogenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup başlangıç materyali ile herhangi bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç somatik embriyogenesis yönteminin ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitlerinde kullanılmasının güvenilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Nandhakumar ve ark (2018), ‘Grand Naine’ ve Rasthali çeşitlerinde yapmış oldukları somatik embriyogenesis yöntemiyle meydana gelen kallusların dokularındaki farklılaşmaları incelemek amacıyla, farklı dönemlerde aldıkları örnekleri kullanarak histolojik çalışmalar yürütmüşlerdir. Araştırmacıların bulguları, yapılan bu tez çalışması ile büyük benzerlik göstermektedir.

Somatik embriyolardan oluşan embriyojenik ve embriyojenik olmayan kallusları ayırt etmek amacıyla Jalil ve ark (2008), *Musa acumunata* da somatik embriyo oluşumların başlamasından, hücre süspansiyonunun oluşturulmasına ve ardından somatik embriyoların bitkiciğe dönüşmesinden, çimlenmeye kadar olan rejenerasyon sürecini kapsayan çeşitli aşamaların histolojik çalışmalarını yapmışlardır. Histolojik incelemede pro-embriyoların kallus yüzeyine bağlanan vasküler demet göstermediğini saptamışlardır. Somatik embriyo oluşumunda gösterge olarak kullanılacak bir diğer faktörün, gelişmekte olan bir embriyonun en dış tabakası olan protodermin varlığı olduğunu söylemişler ve incelemelerinde,

nişasta rezervlerinin birikmesiyle yoğun meristematik embriyojenik hücreleri çevreleyen protodermin varlığını saptamışlardır. Bu tez çalışmasında yapılan histolojik analizlerde benzer olarak embriyo olarak tabir edilen hücrelerde yoğun nişasta birikimi de belirlenmiştir. Bu konuda yapılmış olan literatürler incelendiğinde muzda embriyo gelişimi sırasında hücrelerde nişasta birikiminin olduğu belirlenmiştir. Histolojik bulgularda globular safhanın uzamış hali olan oblong yapılı embriyo, yürek, torpedo ve kotiledon yapılı embriyolar bulunmaktadır. Yapılan tez çalışmasında elde edilen embriyoların somatik embriyo oldukları literatürlerle de desteklenmektedir.



Şekil 4.30. Tez Çalışmasına Ait Aşamalarının Şematize Edilmiş Görünümü



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında kullanılan, meyvesi insanların temel gıdalarından biri olan muz bitkisinin ülkemizde ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan ve üreticilerin tercih ettiği 'Azman' ve 'Grand Naine' muz çeşitlerinin, somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiş, deneme sonucuna göre eksplantların embriyojenik kallus oluşturma, somatik embriyolara dönüşümü ve bitki rejenerasyonu performanslarına bakılmıştır. Çalışmada histolojik analizler yapılarak somatik embriyoların varlığı ve doğruluğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada somatik embriyogenesis yöntemiyle elde edilen bitkilerin genetik kararlılıkları test edilmiştir.

Kallus gelişimini indüklemek ve embriyojenik kallus elde etmek amacıyla MS besin ortamında 2,4-D (0, 0,5, 1.0, 2.0 mg/l), BAP+Pikloram (0,05+ 0,5, 0,05 +1.0 mg/l) olmak üzere farklı konsantrasyon ve konsantrasyon/kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerle çalışılmıştır. Söz konusu denemede kallus oluşturan eksplant sayısı, kallusların tipi, rengi, yapısı gibi parametrelere bakılmıştır. Embriyojenik Kallusları geliştirmek ve embriyo elde etmek amacıyla BAP (0,05 mg/l) ve Pikloram (1.0 mg/l) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Çimlenen embriyolardan bitkiye dönüşüm bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamı kullanılmıştır.

Olgunlaşmamış erkek çiçek tomurcuğu eksplantlarının kallus oluşturma oranları değerlendirildiğinde 'Grand Naine' çeşidi için %58.75 ile 'Azman' çeşidinden daha başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kallus geliştirme denemeleri değerlendirildiğinde, 'Azman' çeşidi için %79.33 ile 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamı başarılı bulunmuştur. 'Grand Naine' çeşidi için %77.15 ile 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamı başarılı bulunmuştur. Kallus geliştirmede çeşitler arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. CL-1-1 adı verilen 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında elde edilen embriyojenik kalluslardan embriyoya dönüşüm uzun süre gerçekleşmemiş olup elde edilen embriyolardan bitkiye

dönüşüm sağlanamamıştır. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitleri için BAP + Pikloram konsantrasyon/kombinasyonlarını içeren kallus geliştirme ortamlarında müsilaj görünümlü oluşumların gelişimi sınırlandırması nedeniyle çalışma boyunca embriyo ve bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. ‘Grand Naine’ ve ‘Azman’ çeşitleri için kallus rengi ağırlıklı olarak krem kahve olup renk yoğunlukları orta-koyu olarak gözlemlenmiştir. Kallusların yapıları 2,4-D içeren besin ortamlarında yumuşak ve dağılmayan (kompakt) formdayken, BAP-Pikloram konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren besin ortamlarında orta-sert ve dağılgan formda olduğu gözlemlenmiştir. Gelişen kalluslarda embriyojenik yapıları geliştirmek ve embriyo oluşumu sağlamak amacıyla 0,05 mg/l BAP+ 1,0 mg/l Pikloram içeren MS besin ortamında altkültüre alınmıştır. Elde edilen embriyojenik yapıların embriyolara dönüşmesini 8 haftalık bir süreç izlemiştir. ‘Azman’ çeşidi için CL-1-2 (%65) ve ‘Grand Naine’ çeşidi için CL-1-3 (%62,5) ortamlarında gelişen kallusların embriyolarından bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Embriyojenik yapıların embriyolara dönüşme sürecinin, krem kahve renkteki kalluslardan koyu kahverengi dönüşen embriyojenik kallusların, farklılaşarak üzerinde saydam beyaz renkte pro-embriyonik yapılar oluşturması şeklinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Oluşan pro-embriyolardan 2 hafta sonra globular embriyolar meydana gelmiştir. Elde edilen embriyojenik kalluslar 8-12 haftalık bir süreçte embriyoya dönüşüm sağlamıştır. Embriyoların ardından hormonsuz MS ortamında indüklenmiş ve embriyolardan 2 hafta sonra bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Bitkiye dönüşüm sırasında kök ve sürgün oluşumu eş zamanlı gerçekleşmiştir. ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait embriyolarda yapılan histolojik analizler sonucunda somatik embriyo oldukları doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda SSR markır sistemi kullanılarak, ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerine ait ana bitki ile somatik embriyogenesis yöntemiyle elde edilen bitkiler arasında genetik olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen bitkilerde kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm), yaprak sayısı (adet), bitki boyu (cm) ve klorofil miktarı parametrelerine bakılmıştır.

Tez çalışması boyunca ‘Grand Naine’ çeşidine ait kallusların ‘Azman’ çeşidine ait kalluslara oranla yavaş gelişme gösterdiği saptanmıştır. Bitki oluşturan bu çeşitlerde ise ‘Grand Naine’ bitkilerinin daha güçlü gelişme gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Embriyoların sürgünlere dönüşmesini 2 haftalık bir süreç izlemiş olup kotiledon yapraklar oluştuktan hemen sonra bitkilerde kök ve yaprak oluşumu eş zamanlı gerçekleşmiştir. Aklimatizasyon işlemi sırasında kayıplar sadece gelişimi sınırlı kalmış olan bitkilerde olmuş olup, iki çeşide ait bitkiler içinde dış ortama adaptasyon yüksek oranda sağlanmıştır. Yaşama oranı ‘Azman’ çeşidine ait bitkiler için %87,5 iken ‘Grand Naine’ çeşidi için %85 olarak saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular sonucunda ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ çeşitlerinde farklı oksin ve sitokininlerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile denemeler kurularak somatik embriyogenesis kapasitelerine bakılması, kullanılacak materyalin rejenerasyon yeteneği açısından çiçek pozisyonuna dikkat edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca muz bitkisine ait dişi çiçek eksplantları için henüz doğum yapmamış bitkilerin yalancı gövdesinin kesilerek kullanılması, üreticinin o yıl ki hevenkten vazgeçmesinin ekonomik kayba neden olacağı için ticari anlamda önerilmemektedir. Somatik embriyogenesis çalışmalarında hücre süspansiyonu yapılmasının daha fazla başarı sağlayacağı düşünülmektedir. Geleneksel yöntemler kullanılarak vejetatif yollarla çoğaltılan muz bitkilerinde, doğru protokol ve multidisiplinler aracılığıyla olgunlaşmamış erkek çiçekleri kullanılarak daha fazla bitkisel materyal elde etmek için somatik embriyo çalışmaları yapılmalı ve genetik materyallerin muhafazası konusunda biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmalıdır. ‘Azman’ ve ‘Grand Naine’ için embriyojenik kallusların embriyolara dönüşümlerindeki kısıtlılık oluşturma nedenleri tespit edilmelidir. Muz bitkisi olgunlaşmamış hermafrodit çiçeklerinin somatik embriyogenesis yöntemi ile bitki rejenerasyonu araştırılmalı, olgunlaşmamış dişi çiçeklerde fenolik salgılama ve embriyojenik kallus oluşturmama nedenleri araştırılmalıdır.

Klonal muz yetiştiriciliğinde başarılı bitki rejenerasyonu ve somatik embriyogenesis protokollerinin geliştirilmesi için somatik embriyolarda enkapsülasyon yöntemi ile sentetik tohum çalışmaları önerilmektedir. Ayrıca bilindiği en uzun muhafaza yöntemi olan Kriyoprezervasyon teknikleri kullanılarak sodyum aljinatla kaplanan somatik embriyolar -196°C 'de saklanma performansları değerlendirilmelidir.



KAYNAKLAR

- Aka Kaçar, Y., 2001. Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No: 640. Adana (Yayınlanmamış).
- Aka Kaçar, Y., 2007. Türkiye Turunçgil Gen Kaynaklarının Moleküler Karakterizasyonu ve SSR Markırlarının Geliştirilmesi, TÜBİTAK Projesi, TOG TAG-3241 Proje Sonuç Raporu
- Ali, K. S., ELhassan, A., Ehiweris, O., & Maki, H. E., 2013. Embryogenesis and plantlet regeneration via immature male flower culture of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Nain. *J Forest Prod Indus*, 2, 48-52.
- Anonim, 2020.
http://www.muz.gen.tr/icerik.asp?mod=35&baslik=%C7e%FEitler#.X1_zv3kzaUk
- Arias, O., 1992. Commercial micropropagation of banana. Biotechnological applications for banana and plantain improvement, INIBAP, 139-142.
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Cote, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B. ,& Grapin, A., 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 20(6), 482-488.
- Barker, W. G., & Steward, F. C., 1962. Growth and development of the banana plant: I. The growing regions of the vegetative shoot. *Annals of Botany*, 26(3), 389-411.
- Bartos, P. M. C., Gomes, H. T., Gomes, S. M., Vasconcelos Filho, S. C., Teixeira, J. B., & Scherwinski-Pereira, J. E., 2018. Histology of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biologia*, 73(12), 1255-1265.

- Biçen, 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. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. Yüksek Lisans Tezi. S, 104.
- Côte, F. X., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiwan, J., Teisson, C., Escalant, J. V., 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv 'Grand Nain'. *Physiol Plant* 97: 285-290.
- Creste, S., Neto, A. T., Vencovsky, R., de Oliveira Silva, S., and Figueira, A., 2004. Genetic Diversit of *Musa* Diploid and Triploid Accessions from the Brazilian Banana Breeding Program Estimated by Microsatellite Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(7): 723-733.
- Crouch, H. K., Crouch, J. H., Jarret, R. L., Cregan, P. B., Ortiz, R. Segregation., 1998. At microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Science*, v.38, p.211-217.
- Dai, X. M., Xiao, W., Huang, X., Zhao, J. T., Chen, Y. F., & Huang, X. L., 2010. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts of dessert banana cv.'Da Jiao'(*Musa paradisiacal* ABB Linn.) via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(5): 403 410.
- Dalkılıç, G. G., 2013. 'Sarılop'incir (*Ficus carica* L.) çeşidi yaprak segmentlerinden somatik embriyogenesis (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi).
- Daniells, J. W., & Smith, M., 1994. Tissue-cultured bananas the full picture. BIPB Annual Report, 29-31.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B., 1983. A Plant DNA Mini Preparation: Version 11. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
- Erişen, S., 2005. Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik Embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu. *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(3): 311-315.

- Escobedo-Gracia-Medrano, R. M., Cruz-Cárdenas, C. I., Sánchez-Cach, L. A., Ku Cauich, J. R., & González-Kantún, W. A., 2018. *In vitro* Proliferation of Female Buds for Induction of Somatic Embryogenesis from False Horn Plantain (AAB, cv. Curraré). In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 215-226). Humana Press, New York, NY.
- FAO, 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Faruk, S., & Soylu, S., 2021. Mersin ilinde yetiştirilen muz meyvelerinde hasat sonrasında görülen fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 399-411.
- Ferreira, E. A., Pasqual, M., Rezende, J. C., 2007. 2,4-D and kinetin in callogenesis of *Ficus carica* L. *Fruit Crops & Trop. Species* (R.E. Litz and R. Scorza Eds.). *Acta Horticulturae*, 738.
- Grapin, A., Ortiz, J. L., Lescot, T., Ferriere N., Côte, F. X., 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 61: 237–244.
- Guimarães, N. C. C., Torga, P. P., Resende, E. C., Chalfun Júnior, A., Paiva, E., Paiva, L. V., 2009. Identification of somaclonal variants in ‘Prata Anã’ banana using molecular and cytogenetic techniques. *Ciênc Agrotecnol* 33: 448–454 (in Portuguese).
- Gübbük, H., Pekmezci, M., & Erkan, M., 2003. Meristem Kültürü İle Çoğaltılan Değişik Muz Klonlarının Açıkta ve Örtüaltında Yetiştirme Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 13(2).
- Gübbük, H., Pekmezci, M., 2001. "Değişik Muz Klonları Arasındaki Genetik Varyasyonların RAPD Markörleri İle Belirlenmesi." *Bahçe* 30. no. 1.
- Hepaksoy, S., Aksoy, U., 2008. *In vitro* propagation of *Ficus carica* cv. Sarılop clone selected for its high performance. *Acta Horticulturae* 798: 199-204.

- Humana Press, Totowa, NJ. Kulkarni, V. M., Suprasanna, P., Bapat, V. A., 2006. Plant regeneration through multiple shoot formation and somatic embryogenesis in a commercially important and endangered Indian banana cv. Rajeli Curr Sci 90: 842–84.
- Hwang, S., Chen, C. L., Lin, J. C., and Lin, H. L., 1984. Cultivation of banana using plantlet from meristem culture. Hort. Sci. 19: 231-233.
- Jalil, M., Khalid, N., Othman, R. Y., 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). Plant Cell Tiss Org Cult 78: 209–214.
- Jalil, M., Chee, W. W., Othman, R. Y., & Khalid, N., 2008. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). Scientia Horticulturae, 117(4), 335-340.
- Kaçar, Y. A., ve Faber, B., 2012. Micropropagation of banana. *Methods Mol Biol.* 2012;877: 143-151.
- Konieczny, R., Sliwinska, E., Pilarska, M., 2012. Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. Plant Cell Tiss Org 109:131–141. doi:10.1007/s11240-011-0081-x
- Kulkarni, V. M., ve Bapat, V. A., 2013. Nesli tükenmekte olan bir muz çeşidi olan Rajeli'nin (AAB) hücre süspansiyon kültürlerinden somatik embriyogenez ve bitki rejenerasyonu. Bitki biyokimyası ve biyoteknoloji dergisi, 22 (1): 132-137.
- Lagoda, P. J. L., Noyer, J. L., Dambier, D., Baurens, F. C., Grapin, A., Lanaud, C., 1998. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. Molecular Ecology, v. 7, p.659 663.
- Lee, K. S., Zapata-Arias, F. J., Brunner, H., & Afza, R., 1997. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51(1), 1-8.

- Marimuthu, K., Subbaraya, U., Suthanthiram, B., Marimuthu, S. S., 2019. Molecular analysis of somatic embryogenesis through proteomic approach and optimization of protocol in recalcitrant *Musa* spp. *Physiol Plant* 167: 282–301.
- Mattos, L. A., Amorim, E. P., Amorim, V. B. D. O., Cohen, K. D. O., & Ledo, C. A. D. S., 2010. Agronomical and molecular characterization of banana germplasm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(2): 146-154.
- Meenakshi, S., Shinde, B. N., & Suprasanna, P., 2011. Somatic embryogenesis from immature male flowers and molecular analysis of regenerated plants in banana ‘Lal Kela’(AAA). *Journal of fruit and ornamental Plant Research*, 19(2): 15-30.
- Morais-Lino, L. S., Santos-Serejo, J. A. D., Silva, S. D. O., Santana, J. R. F. D., & Kobayashi, A. K., 2008. Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 1325-1330.
- Morais-Lino, L. S., Santos-Serejo, J. A., Amorim, E. P., de Santana, J. R. F., Pasqual, M., & de Oliveira e Silva, S., 2016. Somatic embryogenesis, cell suspension, and genetic stability of banana cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(1), 99-106.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473– 497.
- Muz.gen.tr, 2020.
<http://muz.gen.tr/icerik.asp?mod=35&baslik=%C7e%FEitler#.X1VOzIUzbIU>
- Nandhakumar, N., Kumar, K., Sudhakar, D., & Soorianathasundaram, K., 2018. Plant regeneration, developmental pattern and genetic fidelity of somatic embryogenesis derived *Musa* spp. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 587-598.

- Navarro, C., Escobedo, R. M., & Mayo, A., 1997. In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 17-25.
- Natarajan, N., Sundararajan, S., Ramalingam, S., & Chellakan, P. S., 2020. Efficient and rapid *in vitro* plantlet regeneration via somatic embryogenesis in ornamental bananas (*Musa spp.*). *Biologia*, 75(2): 317-326.
- Njuguana, J., Nguthi, S., Wambugu, F., Gitau, D., Karuoya, M., 2011. Enhancing banana crop management by use of tissue-cultured derived planting material in Kenya, *Acta Hort* 897:459–463. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.897.62>
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C., 2001. Somatik Embriyogenesis. *Bitki Biyoteknolojisi-Doku Kültürü ve Uygulamaları* (Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., Eds), Selçuk Üniversitesi Basımevi, pp. 71-88, Konya.
- Paydaş Kargı, S., 2011. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Subtropik Meyveler Ders Notu (Yayınlanmamış).
- Pekmezci, M., Gübbük, H., & Erkan, M., 1997. Investigations on growing possibilities of banana in Turkey. In *II International Symposium on Banana: I International Symposium on Banana in the Subtropics 490* (pp. 599-603).
- Pınar, H., Türkay, C., & Canan, İ., 2007. Türkiye’de Muz Yetiştiriciliği, Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Alatarım*, 15.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, MTP Press Limited, Hingham USA. 697-792.
- Remakanthan, A., Menon, T. G., & Soniya, E. V., 2014. Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. ‘Grand Naine’): effect of explant and culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1): 127-136.

- Robinson, J. C., Galán, S. V., 2010. Banana and plantains. In: Robinson JC, Galán SV (eds) Crop production science in horticulture series, vol vol 19, 2nd edn. CABI International, Cambridge, MA, pp 125–138.
- Robinson, J. D., C. Fraser, and Eckstein, K., 1993. Field comparison of conventional suckers with tissue culture banana planting material over three crop cycles. *Scientia of Horticultural Science*, 68 (6): 831-836.
- Roux, N., Baurens, F.-C., Doležel, J., Hřibová, E., Heslop-Harrison, P., Town, C., Sasaki, T., Matsumoto, T., Aert, R., Remy, S., Souza, M., & Lagoda, P., 2008. Genomics of Banana and Plantain (*Musa* spp.), Major Staple Crops in the Tropics. In *Genomics of Tropical Crop Plants* (Vol. 1, pp. 83–111).
- Ruyue, J. I. N. G., Peilan, W. A. N. G., Huang, Z., & Zhihui, L. I., 2019. Histocytological Study of Somatic Embryogenesis in the Tree *Cinnamomum camphora* L. (Lauraceae). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca*, 47(4), 1348-1358.
- Sarıdaş, M. A., Paydaş, S., Bayıroğlu, B. M., Yağ, Ş., 2017. Türkiye Muz Yetiştiriciliği İçin Yeni Bir Ekoloji. *YYÜ. Tarım Bilimleri Dergisi* 27: 370-377.
- Sezgin, M. Y., & Dumanoğlu, H. T. D., Avrupa Kestanesinde (*Castanea Sativa* Mill.) Olgunlaşmamış Kotiledonlardan Somatik Embriyogenesis ve Bitki Rejenerasyonu (Doctoral Dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı).
- Sharp, W., Evans, D. A., and Sondahl, M. R., 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Fujiwara, A. (ed), *Plant Tissue Culture, 1983, Proceedings of the fifth International Congress of Plant Tissue Culture*, Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, 759-762.
- Simmonds, N. W., 1953. The development of the banana fruit. *Journal of experimental botany*, 4(1), 87-105.

- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., Singh, N., 2016. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits- A review. *Food Chem.* 206: 1-11.
- Strosse, H., Schoofs, H., Panis, B., Andre, E., Reyniers, K., & Swennen, R., 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa spp.*). *Plant Science*, 170(1), 104-112.
- Subaşı, O. S., Seçer, A., Yaşar, B., Emeksiz, F., & Uysal, O., 2016. Türkiye’de muz üretim maliyeti ve karlılık durumu. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 29(2).
- Tangolar, S. G. Büyükalaca, S. Ergenoğlu, F., 2008, Efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: The effect of genotype, media, 2,4-D, and incubation conditions," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32: 311-317.
- Tangolar, S. G., Ergenoğlu, F., & Büyükalaca, S., 2007. Asma (*Vitis Spp.*) Anterlerinden Embriyojenik Kallus ve Embriyo Uyartımı Üzerine Farklı Uygulamaların Etkisi. *Alatarım*, 35.
- Temiz, M. G., & Özgüven, A. I. Nar (*Punica Granatum*)’Da Farklı Büyüme Düzenleyicilerinin ve Farklı Eksplant Kaynaklarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri.
- Turner, D. W., & Lahav, E., 1983. The growth of banana plants in relation to temperature. *Functional Plant Biology*, 10(1), 43-53.
- TÜİK, 2022. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Uma, S., Lakshmi, S., Saraswathi, M. S., Akbar, A., & Mustafa, M. M., 2012. Plant regeneration through somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of *Musa acuminata ssp. burmannica*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5): 539-545.

- Uma, S., Mustaffa, M. M., Saraswathi, M. S., & Durai, P., 2009. Exploitation of diploids in Indian banana breeding programmes. In *V Cellular International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Global Perspectives on Asian Challenges* 897 (pp. 215-223).
- Williams, E. G., & Maheswaran, G., 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of botany*, 57(4), 443-462.
- Yıldırım, A., & Kandemir, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları (S. Özcan., E. Gürel ve M. Babaloğlu). *Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 334-336.
- Youssef, M., James, A., Mayo-Mosqueda, A., Ku-Cauich, J. R., Grijalva-Arango, R., & Escobedo-GM, R. M., 2010. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9(15), 2216-2223.



ÖZGEÇMİŞ

Merve ÖZLEM, Emine Nabi Menemenciođlu İlkokulunda okudu. Adana Büyük Selçuklu Anadolu Lisesi'ni bitirdi. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri lisans programına yerleşti ve 2019 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı.

