

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

SERPİL GÖK TANGOLAR

1202H

**ASMALARDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE
ORGANOGENESİS YOLUYLA BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

**T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
BİTKİ MANTASYON MERKEZİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

120011

ADANA, 2002

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASMALARDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE
ORGANOGENESİS YOLUYLA BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

Serpil GÖK TANGOLAR

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 18/ 09 /2002 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....
Prof. Dr. Fuat ERGENOĞLU
I. DANIŞMAN

İmza.....
Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
II. DANIŞMAN

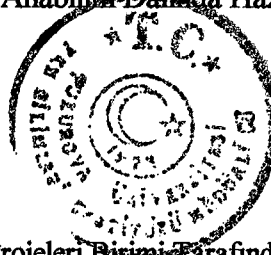
İmza.....
Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU
ÜYE

İmza.....
Doç. Dr. Birhan MARASALI
ÜYE

İmza.....
Doç. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No: 686



Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBE-99. D.1

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

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Somatik Embriyogenesis	7
2.2. Organogenesis	21
3. MATERYAL ve METOD	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Yalova İncisi	29
3.1.2. 41 B	29
3.2. Metod.....	31
3.2.1. Eksplantların Hazırlanması	31
3.2.1.1. Somatik Embriyogenesis	31
3.2.1.2. Organogenesis	32
3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu	32
3.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması	33
3.2.4. Kültür Koşulları	33
3.2.5. Somatik Embriyogenesis Aşamaları	37
3.2.5.1. Embriyojenik Kallus Uyartımı	37

3.2.5.2. Embriyo Uyardımı	40
3.2.5.3. Embriyo Çimlenmesi	42
3.2.6. Organogenesis Aşamaları	42
3.2.6.1. <i>In Vitro</i> Sürgünlerin Elde Edilmesi	42
3.2.6.2. <i>In Vitro</i> Sürgünlerin Çoğaltılması	42
3.2.6.3. Sürgünlerin Köklendirilmesi	43
3.2.6.4. Adventif Göz Oluşumu	43
3.2.7. Elde Edilen Bitkiciklerin Dış Koşullara Ağıştırılması	43
3.2.8. Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi	44
4. BULGULAR	46
4.1. Somatik Embriyogenesis Bulguları	46
4.1.1. Anter Eksplantından Elde Edilen Bulgular	46
4.1.1.1. 41 B	46
4.1.1.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyardımı.....	46
4.1.1.1.(2). Embriyo Uyardımı.....	50
4.1.1.2. Yalova İncisi	51
4.1.2. Yaprak Ayası Eksplantından Elde Edilen Bulgular	51
4.1.2.1. <i>In Vivo</i> Bulguları	51
4.1.2.1.(1). 41 B	51
4.1.2.1.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyardımı	51
4.1.2.1.(1).(b). Embriyo Uyardımı	56
4.1.2.1.(2). Yalova İncisi.....	56
4.1.2.1.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyardımı	56
4.1.2.1.(2).(b). Embriyo Uyardımı	57

4.1.2.2. <i>In Vitro</i> Bulguları	61
4.1.2.2.(1). 41 B	61
4.1.2.2.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	61
4.1.2.2.(1).(b). Embriyo uyartımı	62
4.1.2.2.(2). Yalova İncisi	66
4.1.2.2.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	66
4.1.2.2.(2).(b). Embriyo Uyartımı	67
4.1.3. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular	71
4.1.3.1. <i>In Vivo</i> Bulguları	71
4.1.3.1.(1). 41 B	71
4.1.3.1.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	71
4.1.3.1.(1).(b). Embriyo Uyartımı	72
4.1.3.1.(2). Yalova İncisi	76
4.1.3.1.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	76
4.1.3.1.(2).(b). Embriyo Uyartımı	77
4.1.3.2. <i>In Vitro</i> Bulguları.....	81
4.1.3.2.(1). 41 B	81
4.1.3.2.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	81
4.1.3.2.(1).(b). Embriyo Uyartımı	82
4.1.3.2.(2). Yalova İncisi	86
4.1.3.2.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı	86
4.1.3.2.(2).(b). Embriyo Uyartımı	87
4.1.4. Sülük Eksplantından Elde Edilen Bulgular	91
4.1.4.1. 41 B	91
4.1.4.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı	91
4.1.4.1.(2). Embriyo Uyartımı	92
4.1.4.2. Yalova İncisi	96

4.1.4.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı	96
4.1.4.2.(2). Embriyo Uyartımı	97
4.1.5. Olgunlaşmamış Zigotik Embriyo Eksplantından Elde Edilen Bulgular.....	101
4.1.5.1. 41 B	101
4.1.5.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı.....	101
4.1.5.1.(2). Embriyo Uyartımı	105
4.1.5.1.(3). Embriyo Çimlenmesi	112
4.1.5.2. Yalova İncisi	112
4.1.5.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı.....	112
4.1.5.2.(2). Embriyo Uyartımı	115
4.1.5.2.(3). Embriyo Çimlenmesi	122
4.1.6. Olgunlaşmış Zigotik Embriyo Eksplantından Elde Edilen Bulgular	122
4.1.6.1. 41 B	122
4.1.6.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı.....	122
4.1.6.1.(2). Embriyo Uyartımı	123
4.1.6.2. Yalova İncisi.....	126
4.1.6.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı.....	126
4.1.6.2.(2). Embriyo Uyartımı	126
4.1.7. Elde Edilen Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması İle İlgili Bulgular	128
4.1.8. Elde Edilen Bitkiciklerde Kromozom Sayımı İle İlgili Bulgular	128
4.2. Organogenesis Bulguları	131
4.2.1. Yaprak Ayası Eksplantından Elde edilen Bulgular	131
4.2.1.1. 41 B	131
4.2.1.2. Yalova İncisi	133

4.2.2. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular	136
4.2.2.1. 41 B	136
4.2.2.2. Yalova İncisi.....	137
5. TARTIŞMA	139
5.1. Somatik Embriyogenesis	139
5.2. Organogenesis	150
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	152
6.1. Somatik Embriyogenesis	152
6.2. Organogenesis.....	156
KAYNAKLAR	157
ÖZGEÇMİŞ	166

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ASMALARDA SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE ORGANOGENESİS YOLUYLA BİTKİ ELDE EDİLMESİ

Serpil GÖK TANGOLAR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Birinci Danışman : Prof. Dr. Fuat ERGENOĞLU
İkinci Danışman : Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Yıl: 2002, Sayfa : 166
Jüri : Prof. Dr. Fuat ERGENOĞLU
Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU
Doç. Dr. Birhan MARASALI
Doç. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Bu çalışmada, 41 B Amerikan asma anacı ve Yalova İncisi üzüm çeşidinin farklı eksplantlarından, embriyogenesis ve organogenesis yoluyla bitki elde edilmesinde farklı besi ortamları ve büyümeyi düzenleyici maddeler ile kültür koşullarının etkisi araştırılmıştır.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında eksplant olarak anter, *in vivo* ve *in vitro* yaprak ayası ve yaprak sapı, sülük, olgunlaşmamış ve olgun zigotik embriyo; organogenesis çalışmalarında ise *in vitro* yaprak ayası ve yaprak sapı kullanılmıştır.

Somatik embriyogenesisde kullanılan bütün eksplantlarda uygulamalara göre değişen oranlarda embriyojenik kalluslar meydana gelmiş ancak, yalnızca olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantından somatik embriyolar elde edilebilmiştir.

41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyoları, içerisinde 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D bulunan MS, NN ve B5 ortamlarının aydınlık ve karanlık kültürlerinde değişik oranlarda somatik embriyo oluşturmuşlardır. En yüksek oranda somatik embriyo oluşumu 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamının karanlık kültürlerinde (sırasıyla %30 ve %28.9) saptanmıştır. Yalova İncisinin olgunlaşmamış zigotik embriyoları yalnızca 1 mg/l 2,4-D içeren MS'in aydınlık kültürlerinde %5; 0.5 mg/l 2,4-D içeren NN ortamının aydınlık ve karanlık kültürlerinde ise sırasıyla %6.3 ve %2.3 oranlarında somatik embriyo oluşturmuştur. Sekiz aylık kültür süresi sonunda 41 B'nin B5 + 1 mg/l 2,4-D + karanlık kültürlerinde 559 adet, Yalova İncisi'nin NN + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık kültürlerinden ise 912 adet embriyonun torpedo devresinde olduğu belirlenmiştir.

En yüksek çimlenme ve tam bitkiye dönüşüm oranı 41 B'de hormonsuz NN ortamında (sırasıyla %58 ve %75), Yalova İncisinde ise hormonsuz MS ortamında (sırasıyla %77.4 ve %45) meydana gelmiştir. Elde edilen somatik bitkiciklerin %91.9'u başarıyla toprağa aktarılmıştır.

Organogenesis çalışmalarında adventif göz oluşumu bakımından her iki genotipte en uygun eksplantın yaprak ayası olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 2 mg/l BA eklenen B5 ve NN ortamlarında diğer uygulamalardan daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asma (*Vitis vinifera* L.), Rejenerasyon, Somatik embriyo, Adventif göz oluşumu, Kallus

ABSTRACT

Ph. D. THESIS

PLANT REGENERATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS AND ORGANOGENESIS IN GRAPEVINE

Serpil GÖK TANGOLAR

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

First Supervisor : Prof. Dr. Fuat ERGENOĞLU
Second Supervisor : Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Year: 2002, Pages : 166
Jury : Prof. Dr. Fuat ERGENOĞLU
Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU
Doç. Dr. Birhan MARASALI
Doç. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

In this study, the effects of different media, plant growth regulators and incubation conditions on the plant regeneration from different explants of 41 B American rootstock and Yalova İncisi cv. (*Vitis vinifera* L.) table grape through somatic embryogenesis and organogenesis were investigated.

In the somatic embryogenesis part of the study, as the source of explants, anther, *in vivo* and *in vitro* lamina and petiole, tendril, immature and mature zygotic embryo were used. For organogenesis part, lamina and petiole were isolated from *in vitro* shoots.

From all explants used in somatic embryogenesis occurred embryogenic callus at different rates dependent on different applications. Somatic embryos were only obtained from immature zygotic embryo explants. Immature zygotic embryos of 41 B rootstock cultured on MS, NN and B5 medium supplemented with 0.5, 1, 2 and 4 mg/l 2,4-D produced in different rates of somatic embryos both in light and dark culture conditions. The highest somatic embryo formation rate was determined on B5 medium containing 0.5 and 1 mg/l 2,4-D cultured in dark condition (30% and 28.9% respectively). Immature zygotic embryos of Yalova İncisi produced somatic embryo at 5 percent only in light cultures of MS supplemented with 1 mg/l 2,4-D and besides this in light and dark cultures of NN containing 0.5 mg/l 2,4-D 6.3% and 2.3% rate respectively. After 8 months of culture on B5 + 1 mg/l 2,4-D + dark cultures of 41 B 559 embryos and on NN + 0.5 mg/l 2,4-D + light cultures of Yalova İncisi 912 embryos at torpedo stage has been determined.

The highest germination rate and converting to plantlets rate obtained from 41 B on free NN medium (58% and 75% respectively) and from Yalova İncisi on free MS medium (77.4% and 45% respectively). 91.9 % of the regenerated somatic plantlets were successfully transferred to soil.

Adventitious bud formation in organogenesis studies, lamina was determined as the most suitable explants for both genotypes. In addition, on B5 and NN media supplemented with 2 mg/l BA were obtained the higher values than the other applications.

Key Words: Grapevine (*Vitis vinifera* L.), Regeneration, Somatic embryo, Adventitious bud formation, Callus

TEŞEKKÜR

Türkiye'deki biyoteknoloji çalışmaları içerisinde etkinliği artmak zorunda olan gen aktarma çalışmaları için temel oluşturma özelliği taşıyan doku kültürü konularından olan Somatik embriyogenesis ve Organogenesis konusunda bana tez yapma fırsatı veren ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteği ile değerli yardımlarını gördüğüm birinci danışman hocam Sayın Prof Dr. Fuat ERGENOĞLU' na teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmamın planlanması ve yürütülmesi sırasında verdiği değerli fikir ve önerileriyle beni yönlendiren ikinci danışman hocam Sayın Doç. Dr. Saadet BÜYÜKALACA' ya en içten şükranlarımı sunarım.

Tezimin yürütülmesi sırasında her türlü desteğini esirgemeyen ve çalışmamın fotoğraflarını özenle çekmemize yardımcı olan hocam Prof. Dr. Semih TANGOLAR'a, Bölümümüz olanaklarından etkin bir şekilde yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kazım ABAK'a, yönetimle ilgili her konuda gösterdikleri kolaylıklar nedeniyle başta eski müdürümüz Sayın Prof. Dr. Melih BORAL ve yeni müdürümüz Prof. Dr. Fikri AKDENİZ olmak üzere Fen Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkürlerimi sunuyorum.

Kromozom sayımı ile ilgili çalışmalarında yardımcı olan Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü elemanlarından Yrd. Doç. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ' a, mikroskop resimlerinin çekilmesindeki yardımlarından dolayı Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden Dr. Uğur BAL'a, ve laboratuvar çalışmalarında başlangıçtan itibaren çok değerli yardımlarını gördüğüm Ar. Gör. Hatice BİLİR, Zir. Müh. Gülşen ÜNLÜ ve Zir. Müh. Kader ERÇİK' e teşekkür ederim.

Araştırmanın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu' nun saygıdeğer yöneticilerine teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini her zaman hissettiğim GÖK ailesine ve tez verilerinin değerlendirilmesi ve yazılması sırasında çok akıllı ve uslu hanım hanımcık duran biricik kızım Demet TANGOLAR' a çok teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ	Sayfa No
Çizelge 3.1. MS temel besin ortamının içeriği	34
Çizelge 3.2. Nitsch ve Nitsch temel besin ortamının içeriği	35
Çizelge 3.3. B5 temel besin ortamının içeriği	36
Çizelge 4.1. 41 B anacı anter eksplantlarının değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (1999 yılı)	48
Çizelge 4.2. 41 B anacı anter eksplantlarının değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (2000 yılı)	49
Çizelge 4.3. 41 B anterlerinden elde edilen 1 g yaş kallustan 2,4-D ve BA'nın farklı kombinasyonlarını içeren B5 ortamında ve karanlık koşullarda 4 hafta sonra meydana gelen kallus miktarları	50
Çizelge 4.4. 41 B Amerikan asma anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları.....	53
Çizelge 4.5. 41 B Amerikan asma anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	54
Çizelge 4.6. 41 B Amerikan asma anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	55
Çizelge 4.7. Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	58
Çizelge 4.8. Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	59
Çizelge 4.9. Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	60

Çizelge 4.10.	41 B Amerikan asma anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	63
Çizelge 4.11.	41 B Amerikan asma anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	64
Çizelge 4.12.	41 B Amerikan asma anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	65
Çizelge 4.13.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	68
Çizelge 4.14.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	69
Çizelge 4.15.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	70
Çizelge 4.16.	41 B anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	73
Çizelge 4.17.	41 B anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	74

Çizelge 4.18.	41 B anacından <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	75
Çizelge 4.19.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	78
Çizelge 4.20.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	79
Çizelge 4.21.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vivo</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	80
Çizelge 4.22.	41 B anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	83
Çizelge 4.23.	41 B anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	84
Çizelge 4.24.	41 B anacından <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	85
Çizelge 4.25.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	88

Çizelge 4.26.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	89
Çizelge 4.27.	Yalova İncisi üzüm çeşidinden <i>in vitro</i> koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	90
Çizelge 4.28.	41 B anacının sülük eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	93
Çizelge 4.29.	41 B anacının sülük eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	94
Çizelge 4.30.	41 B anacının sülük eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	95
Çizelge 4.31.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin sülük eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	98
Çizelge 4.32.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin sülük eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	99
Çizelge 4.33.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin sülük eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları	100

Çizelge 4.34.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	102
Çizelge 4.35.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	103
Çizelge 4.36.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	104
Çizelge 4.37.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, embriyojenik kallus ve embriyo oluşturan eksplantların oranları	110
Çizelge 4.38.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların farklı aşamalarındaki sayıları	111
Çizelge 4.39.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların aydınlık koşullarda çimlenme ve tam bitkiye dönüşme oranları	112
Çizelge 4.40.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	117
Çizelge 4.41.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	118
Çizelge 4.42.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları	119

Çizelge 4.43.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, embriyojenik kallus ve embriyo oluşturan eksplantların oranları	120
Çizelge 4.44.	Yalova İncisinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların farklı devrelerdeki sayıları	121
Çizelge 4.45.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyolarda çimlenme ve tam bitkiye dönüşme oranları	122
Çizelge 4.46.	41 B asma anacının olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (1999 yılı)	124
Çizelge 4.47.	41 B asma anacının 6 hafta katlamaya alınan tohumlarından izole edilen olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus oranı ve kallus ağırlığı ile embriyojenik kallus oranı (2000 yılı)	125
Çizelge 4.48.	Yalova İncisinin olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, ve embriyojenik kallus oluşturma oranları	127
Çizelge 4.49.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyolarından elde edilen somatik embriyoların, çimlendirilmesiyle meydana gelen bitkiciklerin dış koşullara aktarılmasından 30 gün sonra alınan sonuçlar.....	128
Çizelge 4.50.	41 B anacının yaprak ayası eksplantlarında adventif göz oluşumu	133
Çizelge 4.51.	Yalova İncisi yaprak ayası eksplantlarında adventif göz oluşumu	134
Çizelge 4.52.	41 B anacının yaprak sapı eksplantlarında adventif göz oluşumu	137
Çizelge 4.53.	Yalova İncisi yaprak sapı eksplantlarında adventif göz oluşumu	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1.	Yalova İncisi üzüm çeşidinin salkım ve yaprakları	30
Şekil 3.2.	41 B Amerikan asma anacının sülük ve yaprakları	30
Şekil 3.3.	Embriyojenik kallus hücreleri	38
Şekil 3.4.	Embriyojenik olmayan kallus ve hücreler	38
Şekil 3.5.	Somatik embriyo oluşumunun devreleri (George, 1993)	41
Şekil 4.1.	2,4-D'nin tek başına kullanıldığı ortamlarda canlılığını kaybeden anterler	46
Şekil 4.2.	1 mg/l 2,4-D + 0.1 ve 0.2 mg/l BA eklenen B5 ortamının karanlık kültürlerindeki anterlerde kallus oluşumu	47
Şekil 4.3.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından farklı ortamlarda meydana gelen somatik embriyolar	106
Şekil 4.4.	Farklı devrelerde bulunan somatik embriyolar	107
Şekil 4.5.	Globular şekilli somatik embriyolar	107
Şekil 4.6.	Kalp şekilli somatik embriyolar	108
Şekil 4.7.	Torpedo şekilli somatik embriyolar	109
Şekil 4.8.	41 B'nin çimlenen somatik embriyoları	113
Şekil 4.9.	41 B'nin çimlenen somatik embriyolarında farklı gelişme durumları	114
Şekil 4.10.	Yalova İncisi'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarından elde edilen farklı devrelerdeki somatik embriyolar	116
Şekil 4.11.	Dış koşullara alıştırılmış somatik bitkilerin farklı gelişme dönemlerindeki görünüşleri	129
Şekil 4.12.	41 B'nin somatik bitkilerinde kromozomların görünümü	130
Şekil 4.13.	41 B anacına ait somatik embriyonun çimlenmesiyle elde edilen somatik bitkicik ve sürgün ucu kültürü ile elde edilen bitkiciğin genel görünümü	130
Şekil 4.14.	41 B anacının yaprak ayası eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü	132
Şekil 4.15.	Yalova İncisi'nin yaprak ayası eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü	135

Şekil 4.16.	41B'nin yaprak sapı eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü	136
Şekil 5.1.	41 B nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantından elde edilen koyu kahverengi kalluslardan somatik embriyoların oluşumu	145
Şekil 5.2.	41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyolarından elde edilen farklı gelişme devrelerindeki somatik embriyolar	148
Şekil 6.1.	41B anacı için geliştirilen somatik embriyogenesis protokolu ...	154
Şekil 6.2.	Yalova İncisi için geliştirilen somatik embriyogenesis protokolu	155



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	2,4,5-triklorofenoksiasetik asit
ABA	Absizik asit
BA	Benziladenin
BAP	6-benzil aminopurin
NAA	α -naftalenasetik asit
NOA	2-naftoksiasetik asit
PIC	4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit (pikloram)
TDZ	N-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-N'-fenilüre (thidiazuron)
GA₃	Gibberellik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-bütirik asit
2 İP	2-izopenten adenin
KIN	Kinetin
TDZ	Thidiazuran
ZEA	Zeatin
MS	Murashige and Skoog (1962)
NN	Nitsch and Nitsch (1969)
B5	Gamborg ve ark. (1968)

1. GİRİŞ

Asma, tarihçesi çok eskilere kadar uzanan önemli bir bitki türüdür ve bu türün kullanım amacına uygun anaç ve kültür çeşitleri yüz yıllardan beri klonal çoğaltma ile muhafaza edilmiştir. Ancak, günümüzde ticari öneme sahip bazı genotiplerde, verim ve kalite düşüklüğü ile özellikle anaçlarda çeşitli toprak ve iklim koşullarına adaptasyondaki güçlük, hastalık ve zararlılara duyarlılık gibi bazı eksiklikler ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpların giderilmesi için yeni asma ıslahı çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Bağcılıkta, yürütülen ıslah çalışmalarında esas itibariyle; farklı ekolojik koşullar için daha erkenci veya daha geççi, adaptasyon yeteneği yüksek, hastalık ve zararlılara dayanıklı, kullanım amacına uygun, kaliteli ve verimli yeni çeşitlerin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu hedefe ulaşabilmek için; 1) Mevcut tür ve çeşitlerde doğal veya yapay mutasyonlarla meydana gelen varyasyonlardan yararlanılmakta veya 2) Beğenilen bir çeşidin bir veya birden fazla karakterinin ıslahına, ya da iki çeşitte var olan olumlu özelliklerin bir çeşit üzerinde toplanmasına çalışılmaktadır.

Asma ıslahının; seleksiyon, melezleme ve mutasyon gibi geleneksel yöntemlerle yapılması zordur ve diğer meyve türlerinde olduğu gibi asma ıslahı çalışmalarında da sorunlarla karşılaşmaktadır. Geleneksel asma ıslahındaki başlıca sorunlar; asmanın uzun bir generasyon süresinin varlığı, yüksek oranda heterozigoti göstermesi ve iyi bir çeşit elde etmek amacıyla kullanılacak özelliklerin polijenik karakterli olmasıdır. Bunlar, yöntemlerin yararlılığını ve yeterliliğini sınırlamaktadır. Asma ıslahında çoğunlukla kullanılan tür içi ve türler arası melezleme çalışmalarında çeşitlerin bazı olumlu özellikleri kaybolabilmekte, bu yöntemlerde bazen istenmeyen özellikler de yeni bireylere geçebilmektedir. Klon seleksiyonu çalışmalarında da istenen özelliklerin bir bireyde toplanması sınırlı düzeyde kalmaktadır.

Belirtilen nedenlerle, bağda geleneksel ıslah çalışmalarının zorluğu veya çoğunlukla istenilen amaca uygun çeşitlerin elde edilememesi karşısında yeni çeşitlerin ıslahında *in vitro* teknikler uygun bir araç olarak görülmektedir (Maitz ve ark. 2000). Son yıllarda yaygınlaşan genetik mühendisliği yöntemlerinin, geleneksel üzüm çeşitlerinin kalitelerinde önemli bir değişiklik yapmadan yeni ve istenilen karakterlerin aktarılmasında oldukça etkili olabildiği belirlenmiştir. (Colby

ve ark., 1991; Berres ve ark., 1992; Gall ve ark., 1994; Scorza ve ark., 1995; Scorza ve ark., 1996; Perl ve ark., 1996 a).

Melezleme ıslahı ile yeni çeşitler elde edilebilmesine karşın, gen aktarma (transformasyon) çalışmalarında, kullanılan çeşitlerin doğrudan modifikasyonu sağlanmaktadır. Bu teknikler, dünyada yetiştirilen şaraplık ve sofralık üzümlerin esas kaynağı olan *Vitis vinifera*'ya gen transferi amacıyla kullanılmıştır (Colby ve ark., 1991; Berres ve ark., 1992; Gall ve ark., 1994; Scorza ve ark., 1995 ve 1996; Perl ve ark., 1996 a; Gölles ve ark., 1997; Kikkert ve ark., 1997; Lipsky ve ark., 1997). Ancak, stabil transjenik bitkilerin, *Vitis vinifera* çeşitlerinden çok, anaçlar ve türlerarası melezlerden elde edildiği bildirilmektedir (Berres ve ark., 1992; Kikkert ve ark., 1996).

Yeni ıslah yöntemlerinin etkin bir şekilde kullanılabilmesi için rejenerasyon yeteneği yüksek eksplantların (hücre, doku veya organların) bulunması ve bunlardan çok sayıda bitkiciğin oluşturulması gerekmektedir. *In vitro* bitki rejenerasyonunun başarılması, gen transferinin yapılmasına ve transjenik bitkilerin elde edilmesine imkan vermektedir. Ayrıca bu yolla, ana bitkinin çoğu özelliği değiştirilmeden, somaklonal varyasyon gerçekleştirilmekte ve böylece yeni genotiplerin seçilmesine de olanak sağlanmaktadır.

Çeşitli bitki türleriyle çalışan araştırmacılar, doku kültürlerinde farklılaşmayı uyarmadaki başarının, çalışma için seçilen genotiplere bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bugüne kadar kültüre alınmış asma eksplantlarından bitki elde edilmesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Hirabayashi ve ark., 1976; Mullins ve Srinivasan, 1976; Krul ve Worley, 1977; Rajasekaran ve Mullins, 1979 ve 1983; Mauro ve ark., 1986; Gray ve Mortensen, 1987; Stamp ve Meredith, 1988 a ve b; Robacker, 1993; Martinelli ve ark., 1993; Mozsar ve Süle, 1994; Emershad ve Ramming, 1994; Mozsar ve Viczian, 1996; Salunkhe ve ark., 1997; Jayasankar ve ark., 1999; Salunkhe ve ark., 1999).

Bitki rejenerasyonunda kullanılan tekniklerden birisi de somatik embriyogenesistir. Somatik embriyogenesis, somatik hücre ve dokulardan embriyo oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Oluşan embriyolar yapı bakımından yumurta

hücresinin döllenmesiyle oluşan zigotik embriyolara benzemektedir (Hatipoğlu, 1997).

Somatik embriyogenesis direkt ve indirekt olmak üzere iki yolla gerçekleştirilebilmektedir. Direkt somatik embriyogenesisde embriyo elde edilmesinde, kallus aşaması oluşmadan eksplant üzerindeki hücre veya hücrelerin farklılaşması görülmekte ve bu tip hücrelere, “embriyojenik hücreler” denilmektedir. İndirekt somatik embriyogenesisde ise, ilk aşamada eksplanttan kallus elde edilmekte, daha sonra bu kallustan somatik embriyoların oluşumu sağlanmaktadır. Somatik embriyo oluşturan kalluslara, “embriyojenik kallus” denilmektedir. Embriyojenik kalluslar; genellikle sıkı bazen gevşek yapıda ve beyazdan açık sarıya kadar değişen renklerde, nadiren de olsa yeşil renkte olabilmektedir. Embriyojenik kallus hücreleri küçük, ince hücre duvarlı, sitoplazmaca zengindir ve çok sayıda küçük vakuoller ve nişasta daneleri içerirler (Büyükalaca, 1993; Hatipoğlu, 1997).

Somatik embriyogenesis, bitki ıslahı, genetik mühendisliği ve bitki çoğaltmak için etkili bir araçtır (Maitz ve ark., 2000). Zimmermann (1993)’ın bildirdiğine göre 1958’de keşfedilen somatik embriyogenesis tekniği model bir bitki olarak havuçta (*Daucus carota*) uygulanmıştır. O günden sonra pek çok bitki türünde somatik embriyogenesis yöntemi başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Asmada somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu ilk olarak, sıvı kültür koşullarında *V. vinifera* çeşidi olan Cabernet Sauvignon’un bir klonunda, döllenmemiş ovüllerin nuseller dokusu kullanılarak yapılmıştır (Mullins ve Srinivasan, 1976). Daha sonra melez bir üzüm çeşidi olan “Seyval” ın gövde parçacıklarından (Krul ve Worley 1977), *V. rupestris* ve *V. rotundifolia*’nın yaprak ve saplarından (Martinelli ve ark., 1993; Robacker, 1993), *V. vinifera* ve *V. rotundifolia*’nın zigotik embriyolarından (Emershad ve Ramming, 1994), son olarak da *V. vinifera* çeşitlerinden Thompson, Sonaka ve Tas-e ganesh’in sülük eksplantlarından düşük oranda somatik embriyo elde edilmiştir (Salunkhe ve ark., 1997).

Asmada somatik embriyogenesis, *V. thunbergii* (Hirabayashi ve ark., 1976), *V. longii* (Rajasekaran ve Mullins, 1983; Gray ve Mortensen, 1987), *V. rupestris* cv. St. George (Rajasekaran ve Mullins, 1983; Stamp ve Meredith, 1988

b; Cersosimo ve ark., 1990), *V. riparia* cv. Gloire de Montpellier (Mozsar ve Süle, 1994), *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon (Mullins ve Srinivasan, 1976; Krul ve Worley, 1977; Rajasekaran ve Mullins, 1979; Mauro ve ark., 1986; Stamp ve Meredith, 1988 b), Grenache (Stamp ve Meredith, 1988 b), Chardonnay, French Colombard, Pinot noir ve White Riesling (Stamp ve Meredith, 1988 a) ile Superior Seedless, Centennial Seedless, Novamuscat Seedless, Ruby Seedless, Italia ve Red Globe (Perl ve ark., 1995 ve 1996 b) ve *V. rupestris* x *V. vinifera* melezi Gloryvine (Rajasekaran ve Mullins, 1979 ve 1983) için rapor edilmiştir. Kullanılan bu genotiplerden somatik embriyolar sağlanmıştır. Türlerarası melez asmalarda da (Krul ve Worley, 1977; Cersosimo ve ark., 1990) vejetatif dokuların kültüre alınması ile *in vitro*'da rejenerasyon gerçekleştirilmiş ve bitkicikler elde edilmiştir.

Somatik embriyogenesise ilişkin başarılı çalışmalarda, eksplant olarak anter (Hirabayashi ve ark., 1976; Rajasekaran ve Mullins, 1979 ve 1983; Mauro ve ark., 1986; Gray ve Mortensen, 1987; Stamp ve Meredith, 1988 b; Cersosimo ve ark., 1990; Langenbucher ve Alleweldt, 1993; Mozsar ve Süle, 1994; Bensaad ve ark., 1996; Salunkhe ve ark., 1999), döllenmemiş ovül (Mullins ve Srinivasan, 1976), yumurtalık (Gray ve Mortensen, 1987), olgun zigotik embriyo (Stamp ve Meredith, 1988 a), olgunlaşmamış zigoik embriyo (Emershad ve Ramming, 1994), genç yaprak ve gövde (Krul ve Worley, 1977), olgun yaprak (Stamp ve Meredith, 1988 b), yaprak sapı (Martinelli ve ark., 1991 ve 1993; Robacker, 1993), ve sülük (Salunkhe ve ark., 1997) kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, somatik embriyolar kallus aşamasından sonra, yani indirekt olarak elde edilmiştir.

Yaprak ve yaprak sapı gibi dokulardan yüksek oranda somatik embriyo elde edilmesi diğer eksplantlara göre daha büyük yarar sağlamaktadır. Çünkü bu eksplantları *in vivo*'dan aktif vejetasyon süresince, *in vitro*'dan ise bütün yıl temin etmek mümkün olmaktadır (Martinelli ve ark., 1993). Düşük oranda somatik embriyo elde edilebilen sülük eksplantları da (Salunkhe ve ark., 1997) aktif vejetasyon süresince alınabilmektedir. Anter, olgunlaşmamış zigotik embriyo, döllenmemiş ovül ve yumurtalık eksplantlarının alım dönemi ise oldukça kısadır ve bunlar ancak *in vivo* koşullarında temin edilebilmektedir.

In vitro 'da bitki rejenerasyonu organogenesis yoluyla da gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemde, adventif sürgün oluşumunu sağlamak için eksplant olarak anter (Hirabayashi ve ark. 1976), kesilmiş sürgün parçaları (Barlass ve Skene, 1978), boğum arası parçaları (Rajasekaran ve Mullins, 1981), yaprak (Stamp ve ark., 1990 a ve b; Tang ve Mullins, 1990; Clog ve ark., 1990; Singh ve Brar, 1993; Martinelli ve ark., 1996; Baydar, 2000) ve yaprak sapları (Baydar, 2000) kullanılmıştır. Adventif sürgün elde edilmesinde de somatik embriyogenesiste olduğu gibi, eksplant kaynağı ve uygulama koşulları oldukça önemlidir.

Bitki ıslahı için gen transferinin kullanımı, bitki genomundaki genlerin girişi için uygun tekniklerin geliştirilmesine bağlıdır. Gen transferi için kullanılan en yaygın yöntemler transjenik dokulardan, bitki rejenerasyonuna izin veren doku kültürü sistemlerine ihtiyaç duymaktadır. Geliştirilecek bir rejenerasyon sistemi gen transferine uygun ve birçok genotipte uygulanabilir olmalıdır.

Başarılı somatik embriyo ve adventif sürgün oluşumları ekonomik olarak önemli bazı *V. vinifera* çeşitleri ve türler arası melezlerden elde edilmiştir. Ancak, kullanılan yöntemlerin büyük bir kısmı birkaç genotipten fazlasına uygulanamamaktadır. Uygun rejenerasyon koşulları çeşite, eksplant tipine ve eksplant kaynağına göre önemli ölçüde değişmektedir (Stamp ve Meredith, 1988 a).

Ülkemizde, asmada somatik embriyogenesis konusunda yapılmış çok az çalışma (Kalyon ve Ağaoğlu, 1999) bulunmaktadır. Bu nedenle böyle bir çalışmanın Türkiye bağıcılığında biyoteknoloji konusunda yapılacak çalışmalara önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Uygulanabilir bir rejenerasyon protokolu, gelecekte gen aktarımı yoluyla yapılacak asma ıslahı çalışmalarına da etkin bir katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla bitki elde edilmesini sağlayacak bir protokolün oluşturulmasıdır. Bu amaçla, *in vivo* ve *in vitro* koşullarında yetiştirilen asma bitki ve bitkiciklerinden alınan farklı eksplantların tipi, yöntemin değişik aşamalarında kullanılabilecek temel ortamlar, büyümeyi düzenleyicilerin türü ve konsantrasyonları ile inkübasyon koşulları araştırılmıştır. Ayrıca, somatik embriyogenesis çalışmasında bir protokol

belirlenememesi durumunda asma için kullanılabilecek bir rejenerasyon protokolünün geliştirilebilmesi için organogenesis yoluyla bitki elde edilmesi olanakları da incelenmiştir. Organogenesis çalışmasında, *in vitro* koşullarında yetiştirilen asma bitkiciklerinden alınan farklı eksplantlar, değişik ortam ve hormon konsantrasyonları ile farklı inkübasyon koşullarına yerleştirilerek bir organogenesis protokolu oluşturulmaya çalışılmıştır.

Doktora tez çalışmasının ilk bölümünde çalışmanın önem ve amacını vurgulamak için bir giriş yapılmış, ikinci bölümünde somatik embriyogenesis ve organogenesis ile ilgili daha önceden yapılmış çalışmalar sunulmuş, üçüncü bölümünde protokol belirlemek amacıyla kullanılan materyal ve metot hakkında bilgi verilmiş, dördüncü bölümünde elde edilen bulgular açıklanmış, beşinci bölümünde elde edilen sonuçlar, literatür bulgularıyla birlikte tartışılmış, altıncı bölümünde ise elde edilen bulgulara dayanarak öneriler yapılmış, son kısmında ise bu çalışma ile ilgili kaynaklara yer verilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Asmada, somatik embriyogenesis çalışmalarında, uygun rejenerasyon koşullarının saptanması amacıyla, değişik çeşit, tür ve melezlerinde eksplant tipi, farklı uygulamalar ve ortamlar ile büyümeyi düzenleyicilerin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

2.1. Somatik Embriyogenesis

Asmada, somatik embriyogenesis ilk olarak **Mullins ve Srinivasan (1976)**, tarafından bir *V. vinifera* çeşidi olan Cabernet Sauvignon'un döllenmemiş ovüllerinde nuseller embriyoninin uyartımıyla (apomiksis) sağlanmıştır. Araştırmada, 5-10 µM BA (benziladenin) ve 5-25 µM NOA (β-naftoksiasetik asit) içeren sıvı kültürde büyüyen ovüllerin nusellus hücrelerinden kallus, bunlardan da somatik embriyolar oluşturulmuştur. 1 µM GA₃ (Gibberelik asit) ve 5 µM IPA (2-izopentenil adenozin) içeren katı bir ortama transfer edilen embriyolardan bitkicik oluşması sağlanmıştır.

Krul ve Worley (1977) çalışmalarında bir melez üzüm çeşidi olan Seyval ((Seyve-Villard 5-276) (*Vitis sp.*))'in boğumarası, yaprak sapı, çiçek sapı ve yaprağın ana damarını eksplant olarak kullanmışlar ve bunlardan kallus elde etmişlerdir. Bu kallusları, içerisinde 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) bulunan bir besin ortamından, NAA (α-naftalinasetik asit) içeren bir besin ortamına aktardıklarında somatik embriyolar elde etmişlerdir. Oluşan bu embriyolar, hormon ve vitamin bulunmayan bir besin ortamına aktarılıp aydınlık koşullarda kültüre alındığında, çimlenerek normal bitki oluşturmuşlardır. Yapılan dokusal incelemelerde, elde edilen bitkilerin, kallustan meydana gelen embriyo benzeri yapılardan oluştuğu saptanmıştır. Birincil embriyolar üzerinde ikincil embriyolar, ikincil embriyolar üzerinde, nadiren de olsa üçüncül embriyolar oluşmuştur. Yaklaşık 1 cm³ kallustan yüzlerce somatik embriyo ve 50 den fazla bitkicik elde edilmiştir.

V. vinifera x *V. rupestris* melezlerinin kültüre alınan anterlerinden oluşan kalluslardan çok sayıda embriyo ve bitkicik elde etme başarısını gösteren **Rajasekaran ve Mullins (1979)**, *V. vinifera*'nın kültüre alınan anterlerinden az

miktarda kallus oluştuğunu ve bunların *in vitro*'da büyümelerinin başarısız olduğunu bildirmiştir. Çalışmalarında embriyo oluşumu için tek çekirdekli mikrosporları bulunan anterler +4°C de 72 saat soğuklatıldıktan sonra 5 µM 2,4-D ve 1 µM BA içeren NN (Nitsch and Nitsch, 1969) ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek embriyo üretimi karanlıkta kültüre alınan anterlerde gerçekleşmiştir. Normal bitkicik üretimi için embriyolar 2 hafta +4°C de soğuklama ihtiyacı göstermiştir. Soğuklatılmayan embriyolardan, çoğunlukla anormal bitkicikler elde edilmiştir. Soğuklama, embriyo oluşumunun herhangi bir safhasında uygulandığı zaman bitkicik büyümesinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Mauro ve ark. (1986), *V. vinifera* çeşidi olan Cabernet Sauvignon'un anterlerinden somatik embriyogenesis yoluyla diploid bitkiler elde etmişlerdir. Araştırmacılara göre polen oluşumundaki ilk mitoz bölünmesine yakın devredeki mikrosporları içeren anterler somatik embriyogenesis için uygun olarak bulunmuştur. Ancak bir görüşe göre optimal fizyolojik anter safhasını belirlemede en önemli özelliğin anter uzunluğu (0.3 – 0.7 mm) olduğu belirtilmiştir. Anterlerden elde edilen kalluslar, yalnızca kazein hidrolizat (250 mg/l) eklenmiş bir ortamda kültüre alındığı zaman somatik embriyolar oluşmuştur. Glutamin (100 mg/l) ve adeninin (1 mg/l) de embriyo oluşumunu uyardığı bulunmuştur. Glutamin ve adenin eklenen ortamlardaki anterlerin %27.9'u kallus, kallusların %81.8'i somatik embriyo oluşturmuş ve embriyoların da %19.4'ü bitkiciğe dönüşmüştür.

Gray ve Mortensen (1987), *V. longii* çeşidi 'Microsperma'nın yumurtalık ve anter eksplantlarını, 5 µM 2,4-D ve 1µM BA içeren katı MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamında kültüre alarak bunlardan embriyojenik kallus elde etmişlerdir. Ancak, oluşan ilk kalluslar kısa ömürlü olur iken, taze kalluslu yığın halindeki embriyoların, dikkatli seçilip uygun ortama düzenli bir şekilde transfer edilmesiyle embriyo oluşumu uzun bir süre muhafaza edilmiştir. Buna alternatif olarak büyümeyi düzenleyicileri içermeyen ortamlar üzerinde birincil embriyolardan meydana gelen ikincil embriyoların oluşmasıyla da kültürler uzun süre muhafaza edilebilmiştir. Yapılan histolojik incelemelerde embriyojenik kallusların yağ benzeri maddeler ve bol miktarda nişasta içerdiği saptanmıştır. Somatik embriyolar tipik olarak, epidermal, cortical ve vascular dokulara sahip, daralıp genişleyen suspensor benzeri

yapılarla kallusa bağlanmıştır. Embriyo hücrelerinde bol miktarda yağ birikimi belirlenmiş ancak, nişastaya rastlanmamıştır. Embriyolar, 1 µM BA içeren ortama yerleştirildiğinde %50'si çimlenerek normal görünüşlü bitkiler oluşturmuşlardır.

V. longii çeşidi Prince ve *V. vinifera* L. çeşitleri Chardonnay, French Colombard, Grenache ve White Riesling'in olgun tanelerinden izole edilen zigotik embriyoları katı NN ortamında kültüre alan Stamp ve Meredith (1988 a) bunlardan somatik embriyoların oluşmasını sağlamıştır. 1.0 mg/l NOA + 0.2 mg/l BAP (6-benzil aminopurin) içeren ortamlarda Chardonnay'da %16, French Colombard'da %13, Grenache'da %32, *Vitis longii*'de %14 oranında somatik embriyo meydana gelmiştir. White Riesling çeşidinde ise, en iyi sonucu %8 oranı ile 1.0 mg/l NOA + 1.0 mg/l BAP içeren ortam vermiştir. Somatik embriyolar, beyaz renkli proembriyo'ların yığılmasından düzenli olarak gelişmiş ve globular, kalp ve torpedo safhalarından geçmişlerdir. Embriyojenik dokular, morfolojik yapılarını düzenli transferler ile bir yıl süreyle korumuşlardır. Zigotik embriyo eksplantları, büyümeyi düzenleyici bulunmayan ortamda kültüre alındığında 10 gün içinde çimlenmiş ve sağlıklı çöğürler oluşturmuştur. Ana kültürlerden izolasyon ve taze ortama transferden sonra somatik embriyoların yaklaşık %40'ı çimlenmiştir. NAA, BAP ve GA₃'in denenen konsantrasyonlarında çimlenme oranı artırılmamış, hatta bazı durumlarda ciddi azalmalar gözlenmiştir. Ancak, NN (NN'in makro, mikro ve vitaminleri ile 5.57 g FeSO₄.7H₂O/litre bulunan) ortamında çimlenme elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler seraya aktarılmış ve morfolojik anormallikler görülmemiştir. Ancak *V. vinifera* çeşidi Pinot noir eksplantlarından somatik embriyo elde edilememiştir.

Stamp ve Meredith (1988 b)'in başka bir araştırmasında *V. vinifera* çeşidi Cabernet Sauvignon'un serada ve *in vitro*'da yetiştirilen; *V. rupestris* St. George (sin. Rup. du Lot) ve PI 200692'nin ise yalnızca serada yetiştirilen bitkilerinden alınan 5 mm'den kısa yaprakları NN ve MS temel ortamında kültüre alındığı zaman somatik embriyolar elde edilmiştir. Benzer şekilde, Cabernet Sauvignon, Cardinal, Grenache, Sauvignon Blanc, Thompson Seedless ve White Riesling gibi *V. vinifera* çeşitleri ile, Rup. du Lot ve PI 200692 ve *V. vinifera* × *rupestris* "Ganzin No 1" in bağda ve serada yetiştirilen bitkilerinden alınan şeffaf, açık yeşil renkli anterler de NN ve

MS ortamlarında somatik embriyolar oluşturmuştur. Yapraklar yalnızca katı ortamlarda özellikle de, eksplantlar ortama batırıldığı zaman embriyojenik yeterlilik göstermiştir. Anterler, katı ortam üzerinde ve ayrıca sıvıdan katıya aktarıldıklarında somatik embriyo oluşturmuşlardır. Bazı büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları hem yaprak ve hem de anter dokusundan veya ikisinden birinde somatik embriyogenesi uyarmıştır. Nitekim NN ortamına 1.0 mg/l NOA ve 0.2 mg/l BAP eklendiğinde bütün genotip eksplantlarının embriyojenik yeterliliği artmış, ancak her zaman optimal bir tepki görülmemiştir. Embriyo oluşumunu; genotip, eksplant tipi ve kaynağı, kültür yöntemi ve kültür ortamı kompozisyonu etkilemiştir. Embriyojenik doku parçaları, eksplantlardan somatik embriyogenesi uyaran aynı formülasyonlu taze ortamda kültüre alındığı zaman embriyojenik dokunun çoğalması gerçekleşmiştir. Düzenli transferler ile, böyle dokuların embriyojenik yeterliliği bir yıldan fazla süreyle muhafaza edilebilmiştir. Büyümeyi düzenleyicilerin olduğu veya olmadığı ortam üzerinde somatik embriyoların izolasyonu ve inkübasyonu bitki gelişimi ile sonuçlanan apikal kök ve sürgün ekseninin büyümesini teşvik etmiştir. Bitkiler toprağa kolayca transfer edilmiş ve morfolojik olarak normal görünmüşlerdir.

Vilaplana ve Mullins (1989), *V. vinifera* çeşitleri Thompson Seedlees ve Gerenache ile *V.vinifera x V.rupestris* melezi Gloryvine 'ın olgun, dinlenme halindeki somatik embriyolarını 10µM BA içeren NN ortamında kültüre aldıklarında hipokotil ve kotiledonlar üzerinden adventif gözlerin oluştuğunu belirlemişlerdir. Hipokotil üzerindeki gözlerin sürmesiyle sürgünler oluşmuş ve daha sonra da bunlar tam birer bitkiye dönüşmüşlerdir. Somatik embriyolardan adventif göz oluşumunu etkileyen diğer faktörlerin genotip, somatik embriyoların dinlenme döneminde olması ve doku orjininin gelişme dönemi olduğu belirlenmiştir

Matsuta ve Hirabayashi (1989), makalelerinde yaprak dokusundan somatik embriyoların uyartımı üzerine daha önce yaptıkları çalışmalarda; 5.0 veya 10.0 µM 2,4-D'nin aynı miktarlarda BA ile yaptıkları kombinasyonların eklendiği bir ortamda somatik embriyogenesinin etkili bir şekilde uyarıldığını ancak, 2,4-D veya BA'dan herhangi birinin veya birlikte eksiklikleri durumunda somatik embriyogenesi oluşumunun uyarılmadığını saptamışlardır. Ortama 2,4-D yerine NAA veya IAA

(indolasetik asit) eklenmesi de bu olumsuz sonucu değiştirmemiştir. Araştırmacılar, somatik embriyogenesis uyartımının genotipe göre değiştiğini bildirmişlerdir. Söz konusu embriyojenik kalluslar aynı ortamda tekrar tekrar alt kültüre alındıklarında yüksek embriyojenik aktivitelerini iki yıldan daha fazla bir süre muhafaza etdiklerini belirlemişlerdir. Bu kalluslar hormonsuz ortama transfer edildiğinde ise, çok sayıda embriyonun oluştuğu görülmüştür. Araştırmacılar çalışmalarında yaprak kalluslarından somatik embriyo elde etme üzerine sitokinin uygulamasının etkisini de incelemişler ve sonuç olarak somatik embriyo oluşumunun başlatılmasında N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (KT-30) ve N-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-N'-phenylurea (TAG) gibi iki sentetik sitokininin etkili olduğunu saptamışlardır.

Martinelli ve ark. (1991), *Vitis rupestris* 'in yaprak ayası ve yaprak saplarını eksplant olarak kullandıkları çalışmalarında bu eksplantlardan somatik embriyolar ve bunlardan da çok sayıda bitkicikler elde etmişlerdir. Araştırmacılar, embriyogenesi teşvik etmek ve embriyoyu olgunlaştırmak için en iyi protokolu belirlemek amacıyla büyümeyi düzenleyicilerin optimal kombinasyonlarını incelemişlerdir. Somatik embriyo uyartımı için en uygun 2,4-D ve BA konsantrasyonlarının yaprak ayası için, 1/0.1 mg/l; yaprak sapı için, 1/1 mg/l olduğunu saptamışlardır. Eksplantlar kültüre alındıktan 7 ay sonra yaprakların %3 ve yaprak saplarının %4'ünde beyaz embriyojenik kalluslar ve globular embriyolar görülmüştür. Araştırmacılar, her bir somatik embriyodan normal gelişen bitkicikler elde etmek için bunların soğuklatılmaya gereksinim duyduklarını belirlemişlerdir. Kallustan-bitkiciğe kadar olan farklı gelişme safhalarını belirlemek için total proteinlerin iki boyutlu elektroforetik analizlerini yapmışlardır. Sonuçta, farklı gelişme safhaları ile ilgili protein yapılarının farklı olabileceği bildirilmiştir.

Coutos-Thevenot ve ark. (1992) çalışmalarında 41 B (*Vitis vinifera* cv. Chasselas × *Vitis berlandieri*) asma anacının anter eksplantlarından elde edilen embriyojenik hücre süspanسیون kültüründen oluşan somatik embriyoların, içerisinde oksin bulunmayan modifiye edilmiş sıvı MS ortamında (yarım güçte MS tuzları + 18 mg/l maltoz + 4.6 mg/l gliserol + 1g/l kazein hidrolizat, pH 5.8) gelişmenin kalp safhasında durduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bunun nedeninin muhtemelen engelleyicilerin kültür ortamına geçmiş olmasından

kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Embriyoların her gün taze ortama aktarılması esasına dayanan yeni kültür koşullarında tam embriyo gelişimini başarıyla sağlamışlardır.

Robacker (1993), Muscadinia çeşidi (*Vitis rotundifolia* Michx.) Regale ve Fry'n olgunlaşmamış yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumunu başlatmak için bunları 9.0 μ M 2.4-D ve 4.4 μ M BA eklenmiş katı NN ortamında kültüre almıştır. Kallus oluşumunu artırmak amacıyla, 5-7 hafta sonra oluşan kallusları ve orijinal dokuları 10.7 μ M NAA ve 0.9 μ M BA içeren NN ortamına aktarmıştır. Araştırmacı elde ettiği embriyojenik kallusları büyümeyi düzenleyicilerin olmadığı NN ortamına aktardığı zaman globular embriyoların oluştuğunu görmüştür. Embriyoları büyümeyi düzenleyicilerin olmadığı taze ortama aldıktan sonra bunların olgunlaşıp çimlendiğini belirlemiştir. Sonuçta yaprak saplarının, yaprak ayalarından daha yüksek oranda somatik embriyo oluşturduğunu tespit etmiştir. Fry'n yaprak saplarının %50'si ve Regal'in %90'nı, benzer sırayla ayaların %14 ve %2'sinin embriyo oluşturduğu kaydedilmiştir. Çimlenmiş somatik embriyolar 1 μ M BA içeren NN ortamı üzerinde kültüre alındığında sürgün büyümelerinin arttığı belirlenmiştir.

Martinelli ve ark. (1993), *V. rupestris*'in yaprak ve saplarından elde edilen kallusları MS ortamına eklenen BA ve 2,4-D'nin (1 + 0.1 mg/l ve 1 + 1 mg/l) iki ayrı kombinasyonunda kültüre aldıkları zaman sırasıyla, %3.2 ve %4.2 oranında somatik embriyo oluştuğunu saptamışlardır. Somatik embriyolardan, embriyojenik kallus, embriyo alt kültürleri ve ikincil somatik embriyolar, MS veya NN ortamlarına 1mg/l IAA veya 0.1 mg/l IBA'nın ikisinden birinin eklenmesiyle elde edilmiştir. Dört aylık bir kültürde, 1 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA eklenmiş 250 mg/l kazein hidrolizat içeren NN ortamına, iki hafta +4 °C 'de soğuklatıldıktan sonra aktarılan embriyoların %13'ünde embriyo çimlenmesi meydana gelmiştir. Soğuklatmanın olmadığı ve ortamda yalnızca IBA bulunduğu zaman 9 ay gibi uzun bir kültür süresinde %51 gibi yüksek bir çimlenme oranı elde edilmiştir.

Emershad ve Ramming (1994) araştırmalarında stenospermokarpik çekirdeksiz üzümün ovüllerinde bulunan olgunlaşmamış zigotik embriyolardan, hormon bulunmayan sıvı Emershad ve Ramming ortamında kültüre aldıklarından iki

ay sonra somatik embriyo oluşumunun meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bu somatik embriyolar izole edilip, 1µM BAP ve % 0.65 agar eklenmiş Emershad ve Ramming ortamına transfer edildiklerinde çoğalmaya devam ettikleri görülmüştür. Somatik embriyolardan bitki oluşumunun; genotipe, ortama, ortamın katı veya sıvı olmasına, embriyonun içinde bulunduğu aşamalara (torpedo, olgun) ve bunların interaksiyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Optimal bitki gelişimi, 2 – 3.99 mm uzunluğundaki somatik embriyoların %1.5 sakkaroz + 1µM BAP + % 0.3 aktif karbon ve % 0.65 agar içeren Woody Plant ortamına aktarılmasıyla meydana gelmiştir.

Birçok araştırmacının çeşitli *Vitis* genotiplerinden somatik embriyo elde etmek üzere yürüttükleri araştırmalarda bitki rejenerasyonunun genellikle düşük düzeyde olduğunu bildiren Mozsar ve Süle (1994), başlangıç kültürlerinden itibaren beş aydan daha kısa sürede *V. riparia* çeşidi olan Gloire de Montpellier'in anterlerinden somatik embriyogenesis yoluyla bitki oluşturmak amacıyla oldukça hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Söz konusu yöntemde katı bir ortamdaki kültür aşamaları arasında kısa bir süre için sıvı ortamda tutmak suretiyle %60 gibi oldukça tatminkar bir rejenerasyon oranına ulaşılmıştır.

Reustle ve ark. (1994)'nın çalışmalarında Seyval Blanc çeşidinin yaprak disklerinden elde edilen embriyo ve embrioidlerden yüksek embriyojenik kapasiteli protoplastlar izole edilmiştir. Bunlar, 4 mg/l NOA ve 0.9 mg/l TDZ (thidiazuron) eklenmiş NN ortamında 4 hafta kültüre alındıktan sonra hormonsuz ortama aktarıldıklarında mikro kalluslardan %38.5 oranında somatik embriyo gelişimi saptanmıştır. 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA veya NOA/TDZ eklenmiş CPW ortamında uyarımdan sonra karşılaştırıldığında sırasıyla %13.8 ve % 1.4 oranında somatik embriyolar oluşmuştur. Bu somatik embriyoların %30'dan fazlası çimlenmiş ve kültür tüplerindeki Linsmaier ve Skoog ortamına transfer edildiklerinde yaklaşık yarısı tam bitkiciğe dönüşmüştür.

Perl ve ark. (1995)'na göre, asmada genetik transformasyon sistemlerinin geliştirilmesi için, bir farklılaşma aşamasından diğer bir farklılaşma aşamasına geçmede rejenerasyon protokollü çok önemlidir. Araştırmacılar, *V. vinifera*'nın ticari çekirdeksiz çeşitlerinin anterlerinden somatik embriyogenesis yoluyla diploid

bitkilerin oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları incelemelere göre bu çeşitlerin embriyogenesinin zor olduğu ve embriyojenik hücre hatlarının uzun süreli muhafazası ile ilgili bir rapor yayınlanmadığını saptamışlardır. Anterleri 2,4-D ve BA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıkları zaman embriyojenik kallus, IASP (indol-3-aspartik asit) ve NOA içeren MS ortamına transfer ettiklerinde embriyo oluşumu meydana geldiğini ve bu ortamda uzun süre muhafaza edilebildiğini belirlemişlerdir. Tek bir embriyo, IASP ve 2,4-D içeren MS ortamına aktarıldığında yeniden kallus oluşumu meydana gelmiş ve bu kallusun uzun süreli muhafazasında ABA (absizik asit) esas önemli rolü oynamıştır. Çimlenme ve bitkicik oluşumunda yüksek oranda anormal, camlaşmış bitkiler gözlenmiştir. Morfolojik normal bitkilerin elde edilmesi, anormal bitkilerin NAA ilave edilmiş MS ortamında köklendirilmesiyle mümkün olmuştur.

Torregrosa ve ark. (1995), VRH 8715 – (*V. vinifera* (Ugni Blanc x Cabernet Sauvignon) x *V. rotundifolia* çeşidi Carlos), VRH 8773- (*V. vinifera* (Cabernet Sauvignon x Alicante Bouschet) x *M. rotundifolia* çeşidi NC 184-4) ve VH1-VRH 8773 x 140 Ru (*V. berlandieri* x *V. rupestris*)’nun boğum kültürlerinden alınan yaprak eksplantları, 5 µM 2,4-D eklenmiş MS ortamında kültürün ilk ayında kallus oluşturup, güçlü bir büyüme göstermişlerdir. Kallus oluşumu kültürün ikinci ayında azalmış ve üçüncü ayda ise durmuştur. Çok fazla embriyojenik oluşumlar 6-10 hafta sonra elde edilmiştir. Embriyogenesis üçüncü ayda azalmış fakat embriyojenik kallus ve embriyolar 6 aylık bir periyotta görünme ve çoğalmaya devam etmiştir. Aktif olarak çoğalan bütün embriyojenik kalluslar, 5 µM IAA ve 1.1 µM BA eklenmiş ortama transfer edildiği zaman çok yüksek oranda bitki oluşturmuştur. Bu ortam üzerindeki, globular embriyolar seçilerek 1.1 µM BA içeren ortama yerleştirildiğinde beyaz, iyi şekillenmiş embriyolar gelişmiştir. Embriyolar çimlenmeyi takiben, hormonsuz ortam bulunan kültür tüplerine aktarıldıklarında %95 oranında normal bitki oluşturmuşlardır.

Hamburg misketi üzüm çeşidinin anter filamentlerini 1 mg/l 2,4-D ve 2mg/l BA eklenmiş B5 ortamında kültüre alan **Lu ve ark. (1996)** 20 gün sonra %30 oranında bir uyartımla embriyojenik kallus oluşturmuştur. Bu kalluslar 0.5 mg/l BA bulunan ortama transfer edildikten 30 gün sonra somatik embriyolar meydana

gelmiştir. Bu embriyolar 0.3 mg/l BA ve 0.01 mg/l NAA içeren ortama aktarıldıktan 30 gün sonra da bitkicikler elde edilmiştir.

Vallania ve ark. (1996), üç üzüm çeşidi (Barbera, Dolcetto ve Nebbiolo) ve ayrıca Barbera çeşidinin tetraploid bitkilerinden alınan genç yaprak diskleri ve yaprak saplarını somatik embriyolar elde etmek için *in vitro*'da kültüre almışlar. Buna ek olarak 2n ve 4n olan Barbera'nın olgun tohumlarının endospermelerini de eksplant olarak kullanmışlar. Yaprak diskleri ve sapları *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden kesilip alınmıştır. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda NOA veya 2,4-D ve BA eklenmiş MS ve NN temel besin ortamları kullanılmıştır. 14 stenospermokarpik çeşitten tam çiçeklenmeden 45 gün sonra ovüller toplanmış farklı konsantrasyonlarda aktif karbon ve IAA, GA₃ içeren NN ortamında kültüre alınmıştır. Kullanılan tüm ortamlarda ve hormon konsantrasyonlarında tüm eksplantlardan kolaylıkla kallus elde edilmiştir. Kök oluşumu, BA eklenmiş NN ve MS ortamında gözlenmiştir. Perlou, Superior Seedless, Imperatrice ve Carina gibi stenospermokarpik bazı çeşitlerin ovülleri test edilen iki ortamda da somatik embriyo oluşturmuştur. Embriyolar BA içeren NN ortamına transfer edilmiştir. Ancak hormonsuz NN ortamına transfer olanlar bitkicik oluşturmuştur.

Faure ve ark. (1996 a), çalışmalarında 1 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BA içeren NN ortamında Grenache Noir üzüm çeşidinin anter eksplantlarını kullanarak embriyojenik kallus, anterin bağ dokusundan (connective tissue) da somatik embriyolar, elde etmişlerdir. Proembriyoların bu kalluslardan veya endotesyum (polen kesesi çeperinin en dışında zayıf gelişmiş bir epidermis tabakası ve bunun da altında endotesyum denilen kuvvetli gelişmiş lifli tabakadır)'dan bir kallus safhası olmadan meydana geldiğini bildirmişlerdir. Her iki durumda da, proembriyolar tek, bol nişasta içeren, farklılaşmış hücrelerden meydana geldiğini ve proembriyoların polaritesinin ilk bölünmelerde suspensorün erken gelişmesiyle saptandığını belirlemişlerdir.

Faure ve ark. (1996 b), Grenache Noir üzüm çeşidinin anter kültüründen elde ettikleri somatik embriyoların, zigotik embriyoların torpedo safhasına benzer histolojik bir yapı gösterdiğini bildirmişlerdir. Somatik embriyoların, kök ve sürgün meristemlerinin erkenden gelişip farklılaşmasıyla bipolar yönler oluşturduğunu ve

hızlı hücrel farklılaşma ile, tek kotiledonlu veya çoklu kotiledonların oluşmasıyla zigotik embriyolardan farklı olduklarını saptamışlardır. Torpedo safhasının sonunda iri embriyo aşamasında somatik embriyoların, kök büyümesi, tanen biriktirme ve ilk deriyi oluşturan hücrelerin oluşması gibi bazı karakteristik çimlenme olayları gösterdikleri ve sürgün ucunun organize olmayıp hızla kaybolduğunu belirlemişlerdir.

Mozsar ve Viczian (1996), asmada somatik embriyo oluşumu üzerine genotipin etkisini 5 *V. vinifera* çeşidi (Chasselas vd.), *V. amurensis* clone No. 66, *V. riparia* çeşidi Gloire de Montpellier ile türlerarası melez anaç G 28 (*V. berlandieri* x *V. riparia* x *V. vinifera*) üzerinde incelemiştir. Eksplant olarak anteri kullandıkları çalışmalarında 8 genotipin 6'sında çeşitli oranlarda somatik embriyo elde etmeyi başarmışlardır. Embriyolar, aydınlık koşullara alınmadan önce karanlık koşullarda, hem katı hem de sıvı ortamda çimlendirilmiş ve rejenerasyon oranı %8-81 arasında değişmiştir. Somatik embriyogenesinin yeniden uyartımı için torpedo ve erken kotiledon aşamasındaki somatik embriyolara iki bitki büyüme düzenleyicisi uygulaması yapılmış ve sonuçta somatik embriyo oluşumunu tekrarlamada ve embriyoların çimlenmesini gerçekleştirmede genotiplerin tepkilerinin oldukça değişken olduğu görülmüştür.

Bensaad ve ark. (1996) araştırmalarında *V. vinifera* L. çeşitleri Regina ve Reichensteiner'in anterlerinden kallus ve somatik embriyo elde etmek için çiçekleri + 4 °C'de 1, 2 veya 3 hafta soğukta tutma, sakkaroz, glikoz, maltoz, galaktoz ve mannitol gibi farklı karbon kaynakları kullanma ile %0.7 agar ve %0.25 gelrite gibi 2 farklı katılaştırıcı maddenin etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Regina çeşidinde, 2 haftalık soğuk uygulaması 1 veya 3 haftalık soğuk uygulaması ile karşılaştırıldığında eksplantların daha yüksek oranda embriyojenik olmasını sağlamış, embriyojenik oranı iyileştirmiş ve çimlenen somatik embriyoların sayısını arttırmıştır. En yüksek kallus oluşumu sakkarozda ve bunu takiben sakkaroz + mannitol, glikoz ve maltozda da gerçekleşmiştir. Mannitol ise kallus oluşumunu sağlamamıştır. Somatik embriyo oluşumu sakkaroz ve glikoz eklenmiş ortamlarda meydana gelmiştir. Reichensteiner çeşidinde de karbon kaynağı olarak ortama eklenen sakkaroz ve glikoz, kallus oluşumu ve somatik embriyogenesisi önemli düzeyde etkilemiştir. Ancak kültüre

alınan embriyolarda embriyojenik oran ve embriyo çimlenmesi, glikoz bulunan ortamda, sakkaroz bulunan ortamdan daha yüksek bulunmuştur. Reichensteiner çeşidinde katılaştırıcı maddenin tipi, karanlık koşullardaki 4 hafta kültüre alma süresince kallus oluşumu üzerine önemli bir etki yapmamıştır. Agar veya gelrite ile katılaştırılan ortamda kültüre alınan anterler benzer bir embriyojenik oran ile somatik embriyo üretmişlerdir. Bu denemelerin hepsinde normal ve anormal somatik embriyolar elde edilmiştir.

Perl ve ark. (1996 b) çalışmalarında *Vitis vinifera*'nın ticari çekirdeksiz çeşitlerinin anterlerinden somatik embriyolar ve bunlardan da diploid bitkilerin elde edildiğini belirtmişlerdir. Anterler, 2,4-D ve BA eklenmiş Chee ve Pool ortamında kültüre alındıkları zaman embriyojenik kallus oluşturmuşlardır. Elde edilen embriyojenik kültürler 2,4-D, NOA, IASP ve BAP eklenmiş MS ortamına transfer edilerek muhafaza edilmiştir. Normal çimlenme ve bitki oluşumu NAA eklenmiş MS ortamında köklendirmeye başarılmıştır. Hygromycin'e dayanıklı stabil transgenik bitkiler, *V. vinifera* çeşidi Red Globe'nin embriyojenik hücre hatlarının genetik değişikliğine aracılık eden *Agrobacterium* vasıtasıyla elde edilmiştir.

Zhu ve ark. (1997), *V. vinifera* çeşidi Koshusanjaku'nun yaprak eksplantlarından elde ettikleri embriyojenik kalluslardan izole ettikleri protoplastlardan yüksek oranda bitki rejenerasyonuna ilişkin basit bir protokol belirlemişlerdir. Somatik embriyo elde etmek için protoplastlar gellan gum disc yöntemi ile başarıyla ayrılmıştır. Bu yöntemde protoplastlar 1×10^5 protoplast / ml yoğunlukta, 2 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 0.09 M sakkaroz ve 0.3 M glikoz içeren, 2 g/l gellan gum ile katılaştırılmış NN ortamına gömülmüştür. Kolonilerin kahverengileşmeden büyümeleri için kültür başlangıcında sıvı stok kültür ortamına ağırlık/hacim olarak % 0.3 oranında aktif kömür eklemek gerektiği belirlenmiştir. Bu kültür koşullarında protoplastlar, kültürün 10. gününden sonra bölünmeye başlamışlar ve kültür başlangıcından 4 ay sonra torpedo safhasındaki embriyolara dönüşmüşlerdir. Torpedo safhasındaki embriyolar, 30 g sakkaroz içeren, 2 g/l gellan gum ile katılaştırılmış ve büyümeyi düzenleyici madde içermeyen NN ortamına yerleştirildiklerinde normal şekilde çimlenmişlerdir. Rejenere olan bitkiler, seraya

başarıyla transfer edilmiş ve bitkiler normal morfolojik görüntülerini sergilemişlerdir.

Popescu (1997), Frumoasa Alba (White beauty), Otilia, Valerien, Mission ve Siegfried Rebe (FS₄) üzüm çeşidi anterlerini (mikrosporların tek çekirdekli olduğu dönem) 4.9 μ M 2,4-D ve 4.4 μ M BA eklenmiş MS ve NN ortamında kültüre almıştır. Bu ortamlarda oluşan ilk kallusların büyümesi ve bitki rejenerasyonu için bunlar 6.6 μ M BA ve 1.1 μ M IAA içeren MS ortamına alt kültüre alınmıştır. 7 ay sonra Frumoasa Alba'dan (%2.7), Otilia'dan (%0.3) ve Valerien'den (%4.5) vejetatif gözler elde edilmiştir. Mission'dan embriyojenik kalluslar ve Siegfried Rebe'den bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Mission çeşidi anterlerinden elde edilen embriyojenik kallusların düzenli transferi ve seçimi ile 4 yıl gibi bir süre embriyogenesis muhafaza edilmiştir. Embriyojenik kallusların normal olmayan somatik embriyolar oluşturabildiği belirlenmiştir (1, 2 veya 3 kotiledonlu, veya kotiledonları kaybolmuş kupa veya boru şeklinde). Embriyojenik olay ile birlikte organogenesisin (göz, yaprak ve sürgün farklılaşması) de düzenli olarak meydana geldiği saptanmıştır.

Regner ve ark. (1997), Grüner Veltliner, Rheinriesling, Blaufrankisch, Zweigelt ve Rösler çeşitlerinden eksplant olarak aldıkları anter, yumurtalık ve bütün çiçekleri kullanarak *in vitro*'da somatik embriyo elde etmeye çalışmışlardır. Yalnızca zigotik olmayan dokulardan, embriyojenik hücreler meydana gelmiştir. En fazla tepki gösteren (aktif olan) dokular yumurtalığın dış kısmı ve anterin filament ve birleşme kısımları olmuştur. Embriyojenik hücreler LSN ortamında kültüre alındığında olgun somatik embriyolar elde edilmiş ve somatik embriyolar burada kök ve sürgün oluşturmuşlardır. Elde edilen bitkicikler başarıyla serada dış koşullara alıştırılmıştır.

Nakano ve ark. (1997), 23 asma genotipinin (*Vitis spp.*) embriyojenik kültürlerini elde etmek amacıyla farklı doku eksplantlarını kullanmışlardır. Eksplantlar başlangıçta 2 ay boyunca kallus uyartım ortamında (C ortamı) kültüre alınmıştır. Eksplantlardan elde edilen kalluslar daha sonra embriyo uyartımı için 1 μ M 2,4-D içeren ortama (E ortamı) transfer edilmiştir. Transferden 4-6 ay sonra embriyojenik kalluslar veya somatik embriyolar uyarılmıştır. *V. vinifera* çeşidi

Koshusanjaku'nin yaprak eksplantlarından somatik embriyo uyartımı için en uygun ortamın 10µM 2,4,5-T ile 10µM CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) veya TDZ kombinasyonunu içeren C ortamı olduğu belirlenmiştir. Somatik embriyo oluşumu, olgunlaşmamış yumurtalık eksplantında yaprak ve anter eksplantından çok daha etkili olarak teşvik edilmiştir. İncelenen 23 çeşit arasında, ikincil embriyo oluşumu yoluyla embriyojenik kallus veya somatik embriyo çoğalması *V. vinifera* çeşitleri Sekirei, Rosario Bianco, Semillon ve Merlot ve *V. labruscana* çeşidi Delaware'yi kapsayan 10 çeşitte saptanmıştır. Bu embriyojenik kültürler, taze E ortamında alt kültüre alındıklarında 20 aydan fazla bir süre, yüksek rejenerasyon kapasitelerini kaybetmeden muhafaza edilebilmiştir.

Trautmann ve Burger (1997), çalışmalarında mevcut sofralık üzüm çeşitlerinin geliştirilmesini ve yenilerinin ıslah edilmesini amaçlayan transformasyon ve seleksiyon tekniklerinde kullanılabilecek somatik embriyogenesis tekniğini yerleştirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada Muscat Seedless x Centennial Seedless melezi geçici bir çeşit ile Sultanina ve Muscat Seedless'in somatik embriyolarının uyartılması ve daha sonra geliştirilmesi için uygun bir protokol geliştirilmiştir. *In vitro* da kültüre alınan olgunlaşmamış yapraklar başlangıç ortamında büyütülmüş ve kallus kültürleri geliştirilmiştir. 5 ay sonra proembriyojenik yığınlar görünmüştür. Bunlar gelişme ortamında 30 gün tutulduktan sonra farklı gelişme devrelerinde embriyolar saptanmıştır. Sultanina'nın embriyo çimlenmesi ve gelişmesini +4 °C de 5 gün soğuk uygulaması iyileştirmiştir. Bouquet ortamı +4 °C de 5 gün soğuk uygulaması ile kombine edildiğinde %50 den fazla oranda çimlenme elde edilmesini sağlamıştır. Bu ortamın MS'den daha fazla amino asit ve daha az şeker içermesi daha iyi çimlenmenin olmasına neden olmuştur.

Salunkhe ve ark. (1997), 1µM BAP eklenmiş Emershad ve Ramming ortamında *V. vinifera* çeşitleri olan Thompson Seedless, Sonaka ve Tas-e-Ganesh'in sülük eksplantlarından oluşturulan kalluslardan somatik embriyolar elde etmiştir. Kallusların aynı ortamda 3. ve 4. alt kültüründe düşük oranda sürgün oluşumu saptanmıştır. Oluşan sürgünler 1µM IAA içeren sıvı köklendirme ortamında tam bitkiciklere dönüşmüştür. Üzümde somatik embriyogenesis için sülüklerin de bir eksplant olarak kullanılabileceği bu çalışmada gösterilmiştir.

Salunkhe ve ark. (1999), başka bir çalışmalarında *Vitis latifolia* L.'nin anterlerinin, 20 μ M 2,4-D ve 9 μ M BAP eklenmiş NN ortamında kültüre alındıktan 4-6 hafta sonra kallus oluşturduğunu saptamışlardır. Kalluslar, 10 μ M NAA ve 9 μ M BAP içeren NN ortamında alt kültüre alındıktan altı hafta sonra somatik embriyolar oluşturmuştur. Somatik embriyolar hormonsuz NN ortamında 6-8 hafta tutulduktan sonra bitkiciklere dönüşmüşlerdir. Bir gram kallusda 400'den fazla somatik embriyo oluşmuş ve bunların %13.7 si bitkiciklere dönüşmüş ve ardından toprağa aktarılmıştır. Rejenere olan bitkilerin hücrelerinin karışık ploidi düzeyine sahip olduğu bulunmuştur.

Thompson Seedless çeşidinin yapraklarından ve Chardonnay çeşidinin anter ve yumurtalık eksplantlarından embriyojenik kültürler ve bunlardan da somatik embriyolar elde eden Jayasankar ve ark. (1999) farklı devrelerde bulunan yaklaşık 1 g gelen somatik embriyoları hücre süspansiyon kültürüne almıştır. Chardonnay çeşidinde tam gelişmiş somatik embriyolar, 2,4-D içermeyen ortamda alt kültüre alınan proembriyojenik yığınlarından elde edilmiştir. Ancak, Thompson Seedless çeşidinin süspansiyon kültüründe somatik embriyo gelişimi kalp safhasından ileriye gidememiştir. 2,4-D bulunmayan sıvı ortama 960 μ m den az proembriyojenik yığın inokülasyonu ile yüksek oranda aynı gelişme safhasına sahip somatik embriyolar elde edilmiştir. 2,4-D içermeyen yarı katı ortamda her iki çeşidin proembriyojenik kütlelerinden oluşan süspansiyonlardan çok sayıda somatik embriyolar oluşturulmuştur. % 3 sakkaroz içeren temel MS ortamında somatik embriyolar olgunlaşmış ve bitkiye dönüşmüşlerdir. Kullanılan bu metotla somatik embriyoların % 60'ından fazlası bitkiye dönüşmüştür. Rejenere olan bitkilerin % 90'dan fazlası başarıyla seraya transfer edilmiştir.

Martinelli ve ark. (2001), *V. vinifera* çeşitleri Chardonnay ve Brachetto'nun olgunlaşmamış anter ve yumurtalıklarından somatik embriyogenesis uyartımı, bitki elde edilmesi ve embriyojenik kültürlerin muhafazası için uygulanabilir bir metot geliştirmiştir. Embriyojenik uyartım oranı Chardonnay ve Brachetto g.l'nin anterlerinde sırasıyla %2 ve %17; her iki çeşidin yumurtalıklarında ise %14 oranında olmuştur. Her iki genotipin embriyojenik kültürleri başlangıçtaki uyartımdan itibaren 3.5 yıl süreyle çoğaltılmış ve hala morfojenik oldukları tespit edilmiştir.

Embriyoların bitkiciklere dönüşmesi için kullanılan iki ortamda (hormon bulunmayan NN ve 4.4 μ M BA + 0.5 μ M IBA + NN) da 100 günlük kültür süresinde Chardonnay'de sırasıyla %37 ve %15 ve Brachetto g.l.'da sırasıyla %30 ve %29 olarak gerçekleşmiştir.

2.2. Organogenesis

Asmada yapılan organogenesis çalışmalarında farklı eksplantlar kullanılmış ve bunlardan bazılarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ekonomik olarak önemli sofralık, şaraplık, kurutmalık ve Amerikan asma anacı çeşitlerinden bazılarında önceden belirlenen metotlar kullanılmıştır. Ancak yüksek oranda bir rejenerasyon geliştirmek için değişik çeşitlerde eksplant tipi, farklı uygulamalar ve ortamlar ile büyümeyi düzenleyicilerin etkisi araştırılmakta böylece bir çok genotipe uygulanabilir ve gen transferine uygun metotlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Rajasekaran ve Mullins (1981), bazı asma genotiplerinin boğum arası eksplantlarını kullanarak organogenesis yolu ile bitki elde etmeye çalışmışlardır. Kullanılan ortam ve genotiplerin büyük bir kısmında adventif kök oluşumu gerçekleşmiştir. Adventif göz oluşumu, 1 μ M BA ve 5 μ M 2,4-D; 1 μ M BA ve 5 μ M NOA; 1 μ M BA + 5 μ M 2,4-D + 5 μ M NOA içeren sıvı NN ortamında kültüre alınan eksplantlarda meydana gelmiştir. Göz oluşumu yalnızca *M. rotundifolia*, Gloryvine (*V. vinifera* L. x *V. rupestris* Scheele) ve *V. vinifera* x Gloryvine, (Grenache x Cabernet Sauvignon) x Gloryvine ve (Sumoll x Cabernet Sauvignon) x Gloryvine'in çöğürlerinden elde edilen kültürlerde meydana gelmiştir. *V. vinifera* çeşitleri ve klonal Gloryvine'in olgun asmalarının çeliklerinden oluşan sürgünlerden alınan eksplantlarda göz oluşumu meydana gelmemiştir. Araştırmada ayrıca, ana bitki ve genotipin olgunluğu, eksplant orijini ve ortam kompozisyonunun etkileri araştırılmıştır.

Cheng ve Reisch (1990)'in araştırmalarında koltuk sürgünlerinden alınan sürgün uçları, 4 μ M BA eklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Burada oluşan yaprak ve saplar *in vitro*da kültüre alındığında yaprak sapı eksplantlarının %70'i ve yaprakların %15'inden fazlasından sürgünler elde edilmiştir. Rejenerasyon 5-10 μ M

BA ve 0.1 – 0.5 μ M IBA içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Rejenerasyon için karanlıkta inkübasyona ihtiyaç duyulmuş ve kültürler karanlıkta 2, 4 ve 8 hafta tutulduğunda sırasıyla %2.5, %15 ve %20 oranında sürgün elde edilmiştir. BA'nın 2,4-D veya NAA ile kombinasyonlarında yaprak eksplantlarından sürgün oluşumu engellenmiştir. Yaprak saplarından ve yapraklardan rejenerasyon her zaman basipetal taraftan olmuştur.

Stamp ve ark. (1990 a) çalışmalarında 2 mg/l BA içeren katı NN ortamında kültüre alınan *V. vinifera* çeşitleri French Colombard ve Thompson Seedless'in boğum kültürlerinden elde edilen sürgünlerden alınan yaprak ayası dokularından ve yaprak kınından (petioler stub) 3 hafta içinde adventif sürgünler geliştiğini bildirmiştir. 1-8 mm uzunluktaki en genç yapraklar kullanıldığında eksplantların %90'ı sürgün oluşturmuş, eksplant olarak 6. yaprak kullanıldığında başarı %16 olmuştur. Kültürün ilk 3 haftası içinde yaprak ayasından, yaprak kınının çıkarılması sürgün üretimini azaltmıştır. Taze ortama aktarılmadan bekletilen boğum kültürlerinden alınan en genç yapraklarda rejenerasyon oranı %43 den %20'ye düşmüştür. Düzenli olarak alt kültüre alınan boğum kültürlerinde, transfer sayısı sonraki rejenerasyonu etkilememiştir. Sürgün ucu kültürlerinden elde edilmiş sürgünlerden alınan yapraklar, boğum kültüründen elde edilen sürgünlerden alınan yapraklardan çok daha fazla etkili olmuştur. Sürgün oluşturma oranı, ikiye bölünmüş yapraklarda (%70) bölünmemiş tam yapraklardan (%43) daha yüksek bulunmuştur. Sürgün oluşumu, rejenere olan dokuların izole edilerek taze rejenerasyon ortamına alt kültüre alınmasıyla teşvik edilmiştir. Yaprak kınının kesilip çıkarılması ile yaprak ayasında oluşan yara yeri sürgün oluşumunu uyarmıştır. Sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS ortamında yüksek oranda köklenmişler ve morfolojik olarak normal bitkiler oluşturmuşlardır.

Stamp ve ark. (1990 b), *V. vinifera* çeşitleri Cabernet Sauvignon, French Colombard, Grenache, Thompson Seedless ve White Riesling, *V. rupestris* çeşidi St George ve *V. vinifera* x *V. rupestris* çeşidi Ganzin 1'in *in vitro*da büyüyen yapraklarından adventif sürgünler geliştiğini bildirmişlerdir. 15 mm'den daha küçük yaprak eksplantları boğum kültürlerinden kesilip çıkarılmış ve 0, 1, 2, veya 4 mg/l BA içeren MS veya NN temel rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak

kınından ve nadiren de yaralanmış yaprak ayası dokusundan 4 hafta içinde adventif sürgünler gelişmiştir. Sürgün oluşumu yalnızca BA içeren ortamlarda ve 2 mg /l BA içeren ortam üzerinde 1 veya 4 mg/l içerenden daha yüksek oranda meydana gelmiştir. Yaprak eksplantlarından 2 mg/l BA içeren ortamda, Cabernet Sauvignon'dan %47, French Colombard'dan %67, Thompson Seedlees'dan %60 ve White Riesling'den %42 gibi yüksek oranda, Grenache ve St George'dan %14 ve Ganzin 1'den %29 gibi diğer genotiplerden biraz düşük oranda adventif sürgün olmuştur. Katı kültür ortamı, sıvı ortamdan daha iyi sonuç vermiş ve katı ortama transfer sıklığı rejenerasyon oranını etkilememiştir.

Rejenere olan sürgünlerin büyümesi, taze rejenerasyon ortamına transferle teşvik edilmiştir. Eksplantların %80'den fazlası başlangıçta adventif gözler oluşturmuş ve daha sonra da sürgün büyümesi göstermiştir. Her bir eksplanttan ortalama 6 dan fazla sürgün meydana gelmiştir. Sürgünler kolaylıkla köklendirilmiş ve bu bitkiler morfolojik olarak, ana bitkiye benzemiştir.

Clog ve ark. (1990) araştırmalarında bazı asma genotiplerinin (Kober 5 BB, 41 B, LN 33 ve 1613 C anaçları ile Pinot noir ve Chardonnay üzüm çeşitleri) yaprak dokularından organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu için bir yöntem belirlemişlerdir. *In vitro* koşullarda yetiştirilen bitkiciklerden veya büyüme kabinde yetiştirilen olgun bitkilerden alınan yapraklar bir bistürü ile yaralanmış ve BA'nın farklı konsantrasyonlarını (0, 2.21, 4.43, 6.65, 8.87 ve 13.29 μ M BA) içeren değiştirilmiş sıvı MS ortamında kültüre alınmıştır. Sonuçta sürgün oluşumu için BA'nın varlığına mutlaka ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir. Kullanılan genotiplerde rejenerasyon kapasitesi farklı olmuştur. En yüksek organogenik kalluslar 5 BB'den %38.6 oranında elde edilmiş ve bunların yalnızca %30'unda adventif göz oluşumu meydana gelmiştir. *V. vinifera* çeşitlerinden Pinot noir ve Chardonnay'den rejenerasyon sağlanamamıştır. Eksplant kaynağının yaşı, kültür ortamının bileşimi ve kültür sıcaklığının rejenerasyon için en önemli parametreler olduğu tespit edilmiştir.

Cersosimo ve ark. (1990)'nın bildirdiğine göre *Rupestris du Lot* ve *V. berlandieri* $\times$ *V. rupestris* melezi olan Px'in kültüre alınan anterlerinden oluşan kalluslardan embriyogenesis ve organogenesis yoluyla tam bitkiler elde edilmiştir.

Yapılan dokusal incelemelerde bitkilerin diploid ve somatik bir orjinden geldiği belirlenmiştir. Glucose phosphate isomerase (GPI) ve phospo gluco mutase (PGM) kullanılarak yapılan izozim analizleri sonucunda somatik bitkilerin, arazide yetiştirilen ana bitkilerle genetik bir benzerlik içinde olduğu saptanmıştır.

Colby ve ark. (1992), French Colombard çeşidinin *in vitro*'da kültüre alınan yaprak saplarından direkt sürgün oluşumunun anatomisini ışık mikroskobu ile incelemiştir. Rejenere olan yaprak sapı parçaları 2 veya 3 gün arayla uzunluğuna kesilmiş ve fikse edilmiştir. Rejenerasyon ortamında 3 günlük iken, yeni hücre bölünmeleri belirlenmiştir. 6 gün sonra meristematik aktivitenin 3 farklı bölgesi yaprak sapı parçasının genişleyen kısmında, yaraya tepki, organogenik ve vasküler bölgelerde görünmüştür. Organogenik bölgede, vakollin dışında kortikal hücrelerin hızlı dış bölünmeleri ile nodüler çıkıntılar oluşmuştur. Bunların çoğunda vasküler bağ ve kenar meristemleri gelişmiş ve adventif yapraklar oluşmuştur. Pro meristemler, küçük, yoğun hücreler ve farklı bir tunika tabakası da organogenik bölgede epidermal ve altepidermal hücre tabakasında hücre bölünmesiyle meydana gelmiştir. Yaprak primordia'sının ve vasküler dokuların oluşumu ile birçok promeristemler adventif sürgün meristemlerine dönüşmüştür. Adventif yaprak ve promeristemler 10. dan 33. güne kadar sürekli oluşmuştur. Adventif yaprak ve sürgün meristemleri, orjinal eksplantın iletim demetleri ile vasküler bağlantılar geliştirmiştir.

Martinelli ve ark. (1996), çalışmalarında *V. vinifera* (Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Canner Seedless Bianco, Chardonnay, Enantio, Moscato Bianco, Riesling, Sultana Moscato Bianco ve Sultanina Rouge), *V. vinifera silvestris* G, *V. amurensis* R., *V. armata* D. ve G., *V. riparia* M., *V. simpsonii* M., 110 R ve Schwarzmann anaçları ile türlerarası melez çeşit Staufer'in rejenerasyon potansiyellerini incelemişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları genotiplerden *in vitro*'da 2 mg/l BA bulunan NN ortamında boğum kültürü yoluyla sürgün elde etmişler ve bu sürgünlerden aldıkları yaprakları 2.25 mg/l BA ve 0.03 mg/l NAA bulunan ½ MS ortamında kültüre almışlardır. Rejenerasyon genç yapraklardan direkt organogenesis yoluyla teşvik edilmiştir. Morfojenik potansiyel üzerine genotipin etkili olduğu belirlenmiştir. Test edilen 18 genotipde rejenerasyon oranı genotiplere

göre değişmiş ve bitki oluşumu farklı sürelerde meydana gelmiştir. Enantio ve Cabernet Sauvignon'da sürgün rejenerasyonu zor iken; Sultana Moscato, Riesling, Chardonnay ve Cabernet Franc'dan kabul edilebilir yeterlilikte rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Kullanılan rejenerasyon sisteminde en iyi sonucu *V. armata* vermiştir.

Büyükdemirci (1997), çalışmasında *in vitro*'da kültüre aldığı Valiant, Chancellor ve St. Croix çeşitlerinin yapraklarından direkt sürgün oluşumu ve bitki elde edilmesi üzerine ortam, sakkaroz, oksin ve sitokinin tipi ve konsantrasyonlarının etkili olduğunu belirlemiştir. *In vitro*'dan elde edilen yaprakların üst yüzeyi ortama degecek şekilde yerleştirildiğinde yaprak kını ve/veya yaralanmış damarlardan direkt rejenerasyon meydana gelmiştir. Çoğunlukla NN ortamı MS ortamından daha yüksek rejenerasyon yüzdesi oluşturmuştur. Sakkaroz konsantrasyonu %1'den %3'e arttırıldığında yapraklar kahverengileşmiş ve yapraklardan daha düşük bir rejenerasyon meydana geldiği görülmüştür. En iyi sonucu Valiant çeşidi vermiş ve bunu Chancellor ve St. Croix çeşidi takip etmiştir. En yüksek rejenerasyon yüzdesi 1 mg/l BA veya 0.2 mg/l TDZ eklenmiş ve %1 şeker bulunan NN ortamında Valiant çeşidinin yapraklarından %91.7 oranında elde edilmiştir. 2,4-D bulunan MS veya NN ortamlarından her hangi birinden rejenerasyon sağlanamamıştır.

Beş üzüm çeşidi (Ata sarısı, Çavuş, Kalecik karası, Sultani Çekirdeksiz ve Yapıncak) ile 2 asma anacına (Kober 5 BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) ve 41 B (*Chasselas* x *V. berlandieri*)) ait yaprak eksplantlarından organogenesis yoluyla adventif sürgün elde etme üzerine bir araştırma yapan Baydar (2000), rejenerasyon üzerine genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamının etkilerini incelemiştir. Eksplant kaynağı olarak kullanılan yaprak sapı ile yaprak ayaları *in vitro* da yetiştirilen sürgünlerden izole edilmiştir. Araştırmacı, yaprak saplarını, 1, 2, 3 mg/l BAP, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA bulunan MS ve NN besin ortamlarında kültüre almıştır. Araştırma sonunda, adventif sürgün oluşumu için en uygun besin ortamının, Kalecik karası, Çavuş, Sultani Çekirdeksiz ve Kober 5 BB için 2 mg/l BAP katkılı MS besin ortamı olduğunu tespit edilmiştir. Bu besin ortamında kültüre alınan Kalecik karası, Çavuş, Sultani Çekirdeksiz ve Kober 5 BB'ye ait yaprak saplarının %34.7 –56.0'si; yaprak ayalarının da %18.7 – 22.7'si adventif sürgün oluşturmuştur.

Yapıncak, Ata sarısı ve 41 B için ise 2 mg/l BAP katkılı NN ortamının en uygun besin ortamı olduğunun belirlendiği araştırmada, bu genotiplere ait yaprak saplarının %16.0 – 34.7'sinin, yaprak ayalarının da %8.0 – 14.7'sinin adventif sürgün oluşturdukları saptanmıştır. Araştırmada ayrıca adventif sürgün oluşturma yetenekleri bakımından genotipler arasında farklılıkların bulunduğu da belirlenmiştir. Yaprak saplarından adventif sürgün oluşumu, Kalecik karası (%34) ve Sultani Çekirdeksiz'de en fazla (%32.7); Kober 5 BB (%23), Çavuş (%21.5) ve Yapıncak (%21.2)'ta orta derecede; Ata sarısı (%18) ve 41 B (%8.5)'de ise en düşük oranda elde edilmiştir.

Youngju ve ark. (2001) çalışmalarında *V. labrusca* x *V. vinifera* melezi olan Kyoho üzüm çeşidinin yaprak eksplantlarından organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunu sağlamak için ortam bileşimini ve kültür koşullarını iyileştirmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar, *in vitro*'da kültüre aldıkları yaprak parçalarından adventif sürgün oluşumunun, temel ortam, bitki büyüme düzenleyicileri ve ışık gibi faktörlerden etkilendiğini belirlemişlerdir. Sürgün rejenerasyon ortamında, kültürün ilk 7 gününde eksplantın yaprak kını kabarmış ve kallus oluşmuştur. 14 gün sonra yaprak kını üzerinde adventif yapılar gözlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BA ve 0.01 mg/l IBA ile saptanmıştır. Modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde, adventif sürgünler etkili olarak rejenere edilmiştir. Test edilen katılaştırıcılardan agar, agarose ve phytogelden daha fazla sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Kültürün başlangıç aşamasında, eksplantların 3-4 hafta karanlıkta inkübe edilmesi sürgün rejenerasyonunda etkili olmuştur. En iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l BA, 0.01 mg/l IBA ve 8 g/l agar eklenmiş 1/2 TMS ortamında 3 hafta karanlıkta inkübasyonu takiben elde edilmiştir. Bu durumda rejenerasyon oranı % 80'e ulaşmıştır. Rejenere edilen sürgünler 0.1 mg/l IAA eklenmiş MS ortamında başarıyla köklendirilmiştir.

Önceki çalışmaları toplu halde genel olarak incelediğimizde, çalışmalarda en iyi rejenerasyon protokolünü belirlemek için araştırmacılar farklı asma genotipini, eksplantları, ortamları, büyüme düzenleyicilerin türünü ve konsantrasyonlarını, kültür koşullarını belirlemeye çalışmışlardır.

Asmada başarılı embriyogenesise ilişkin çalışmalarda, eksplant olarak; anter, döllenmemiş ovül, yumurtalık, zigotik embriyo, olgunlaşmamış ve olgun yaprak, yaprak sapı, boğum araları ve sülük kullanılmıştır.

Anterlerle yapılan araştırmalarda; soğuk uygulaması, farklı karbonhidrat kaynakları ve katılaştırma maddesi gibi somatik embriyogenesisi etkileyen birkaç faktör bulunmuştur. Asmada, anterleri kültüre almadan önce çiçekleri soğuklatmanın, embriyojenik anterlerin oranında bir artmaya neden olduğu bildirilmiş (Rajasekaran ve Mullins, 1979) ve anterlere soğuk uygulamasının kullanımı üzerindeki araştırmaların çoğunda 3 gün (Rajasekaran ve Mullins, 1979 ve 1983; Mauro ve ark., 1986, Gray ve Mortensen, 1987 ve Perl ve ark., 1995) veya nadiren de 4 gün ön soğutma önerilmiştir. Öte yandan, bazı araştırmacılar da soğuk uygulamasına gerek olmadığını bildirmişlerdir (Hirabayashi ve ark., 1976; Stamp ve Meredith 1988 a; Mozsar ve Süle, 1994).

Somatik embriyogenesis çalışmalarında anter rengi ve büyüklüğü üzerinde de durulmuş ve sarı anter rengi (Stamp ve Meredith, 1988 a) veya 0.5-0.7 mm anter uzunluğu (Mauro ve ark, 1986) embriyojenik yeterliğin en önemli belirtisi olarak nitelenmiştir.

Diğer taraftan bazı araştırmacılar, tam çiçeklenmeden 5-15 gün önce alınan 0.5-1.0 mm uzunluğundaki anterlerin başarılı olduğunu saptamışlardır (Perl ve ark.,1995, 1996 b).

Yaprak eksplantları 1.5-5 mm (Stamp ve Meredith, 1988 b; Baydar, 2000; Matsuta, 1989), yaprak sapı 15 mm veya (Robacker, 1993), 2-3 mm (Baydar, 2000), sülük 1 cm uzunluğunda (Salunke ve ark., 1997), zigotik embriyo ise 0.5-1.5 mm (Stamp ve Meredith 1988 a) büyüklüğünde kullanılmıştır.

Araştırmalarda genellikle MS (Murashige ve Skoog, 1962), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969), B5 (Gamborg ve ark., 1968) ve CP (Chee ve Pool, 1987) ortamlarının kullanıldığı saptanmıştır. Ancak, kültürün farklı aşamalarında kullanılan büyümeyi düzenleyici maddeler ve konsantrasyonları değişmektedir. Embriyojenik kallus uyartımı aşamasında genellikle 2,4-D'nin 1.1, 2.0 mg/l , BA'nın 0.2, 1.0 mg/l konsantrasyonları (Mauro ve ark., 1986; Cersosimo ve ark., 1990; Mozsar ve Süle, 1994; Perl ve ark., 1995,1996 b) kullanılırken; diğer aşamalarda 2,4-D, BA,

NOA, IASP, ABA, NAA gibi büyümeyi düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarının (Mauro ve ark., 1986; Cersosimo ve ark., 1990; Mozsar ve Süle, 1994; Perl ve ark., 1995,1996 b) tercih edildiği görülmektedir.

Şeker, bitki doku kültürlerinde çok yaygın olarak kullanılan bir karbonhidrattır. Üzümün de dahil olduğu birçok bitki türünde (Stamp ve Meredith, 1988b; Emershad ve Ramming, 1994) embriyogenik kallus'un oluşumu için ana karbonhidrat kaynağı olarak %1 den (Mazsar ve Sule, 1994) %6' ya kadar değişen (Emershad ve Ramming, 1994; Perl ve ark., 1995) çeşitli konsantrasyonlarda sakkaroz kullanılmıştır. Agar ise bitki doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir katılaştırıcı maddedir. Üzümde somatik embriyogenesinin oluşumu ile ilgili çalışmaların çoğunda agar katılaştırıcı madde olarak %0.65 ile %0.8 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Mozsar ve Sule, 1994; Robacker, 1993; Bensaad ve ark., 1996). Nadir olarak da %0.25 veya %0.3 oranında Gelrite'e yer verilmiştir (Perl ve ark., 1995; Bensaad ve ark., 1996).

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırma, 1998 – 2001 yıllarında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağından alınan bitkisel materyallerle aynı bölümün Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

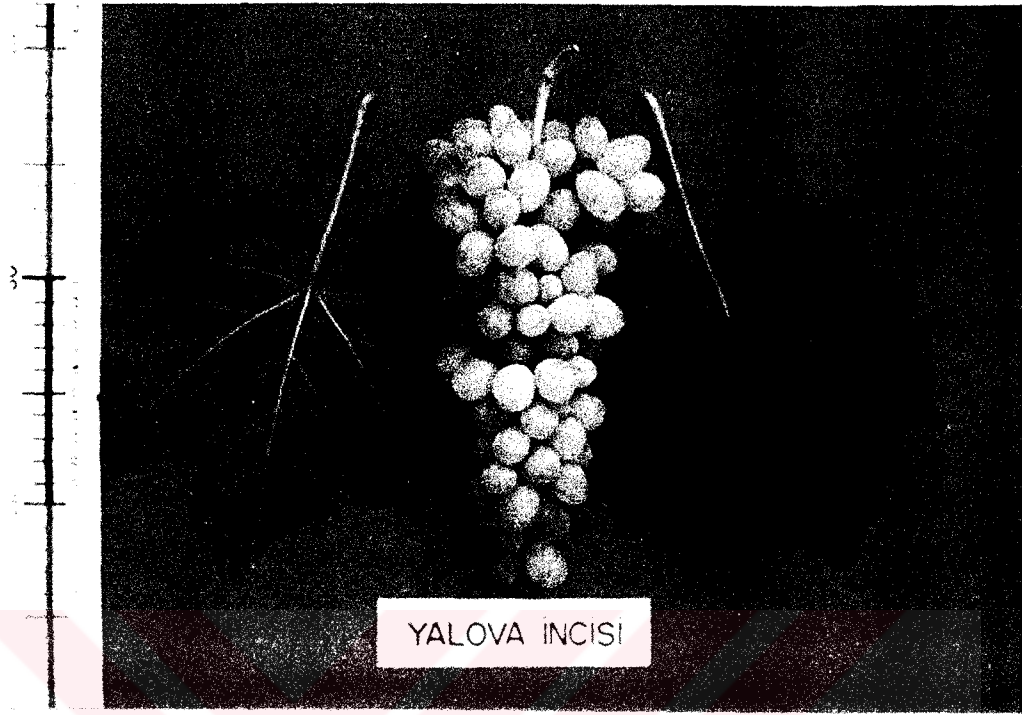
Çalışmada bitkisel materyal olarak Yalova İncisi üzüm çeşidi (*V. vinifera* L.) ve 41 B M.G. (*ChasselasxBerlandieri*) Amerikan asma anacının Bölüm Araştırma Bağında yetiştirilen bitkilerinden ve *in vitro* da yetiştirilen bitkiciklerden alınan eksplantlar kullanılmıştır. Denemede yer alan genotiplerle ilgili genel özellikler aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Yalova İncisi

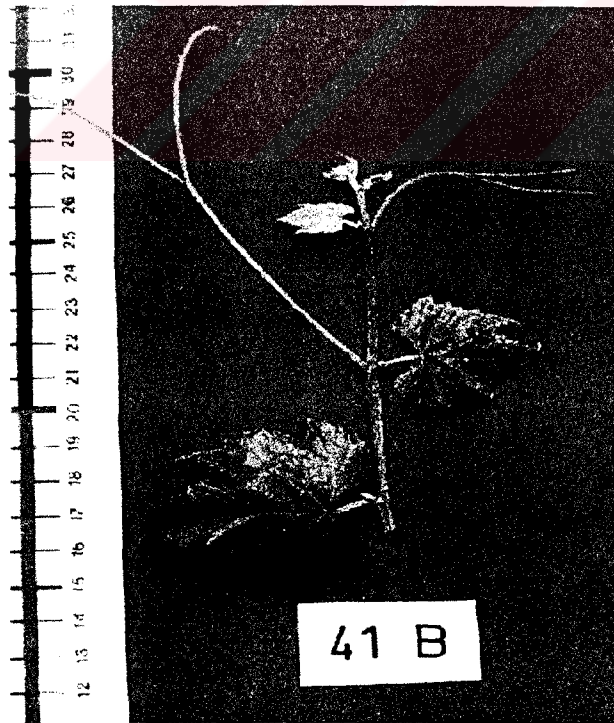
Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde Hönüsü ile Siyah Gemre melezi olarak elde edilmiştir (Şekil 3.1). Omca gelişmesi orta, verimi yüksektir. Erdişi çiçek yapısına sahip çeşidin salkımları orta büyüklükte, silindirik ve konik şekilli ve hafif gevşek yapılıdır. Taneleri oval şekilli, kabuk orta kalınlıkta ve sarı renklidir. Tane eti az sulu, lezzetli ve çekirdeklidir. Cardinal'den bir hafta önce olgunlaşmaktadır. Son yıllarda Akdeniz bölgesinde hızlı bir yayılma eğilimi göstermektedir (Tangolar ve ark., 1996).

3.1.2. 41 B M.G.

V. vinifera çeşidi Chasselas ile *V. berlandieri* melezi olan 41 B anacı Millardet tarafından elde edilmiştir (Şekil 3.2). Kısa bir vejetasyon periyoduna sahip olan bu anaç yüksek oranda aktif kirece (%40) dayanımı ile bilinmektedir. Vejetasyon döneminin kısa olması nedeni ile üzerine aşılanan üzüm çeşitlerini daha erken olgunlaştırmaktadır. Tuzluluğa ve nematod zararına karşı duyarlı olan 41 B anacı kurağa dayanıklı olarak bilinmektedir. En önemli sorunu çeliklerde köklenme yeteneğinin zayıf oluşudur. Bu da aşı köklü asma fidanı üretiminde başarıyı sınırlamaktadır (Oraman, 1959; Çelik, 1998).



Şekil 3.1. Yalova İncisi üzüm çeşidinin salkım ve yaprakları



Şekil 3.2. 41 B Amerikan asma anacının sülük ve yaprakları

Somatik embriyogenesis çalışmaları için bu genotiplerin *in vivo*'da yetişen bitkilerinden anter, yaprak ayası, yaprak sapı, sülük, olgunlaşmamış zigotik embriyo ve olgun zigotik embriyo; *in vitro*'da yetişen bitkilerden ise yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantları alınmıştır.

Organogenesis çalışmalarında ise, eksplant olarak yalnızca *in vitro*'da yetişen bitkilerden alınan yaprak ayası ve yaprak sapı kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1.Eksplantların Hazırlanması

3.2.1.1. Somatik Embriyogenesis

Anter: Bunun için çiçekler açılmadan 5-15 gün önce şeffaf, açık yeşil renkte ve 0.5-1 mm uzunluktaki anterlere sahip çiçek salkımları alınmıştır. Kültüre alma öncesinde bu salkımlara buzdolabında +4 °C de 72 saat süreyle soğuk uygulaması yapılmıştır. Soğuk uygulamasından sonra her bir çiçekten anterler çıkarılmış ve bu anterler her uygulama için 5 yinelemeli olarak besin ortamlarına yerleştirilmiştir. Her yineleme her birinde 5 eksplant bulunan ikişer petriden (toplam 10 eksplanttan) oluşmuştur.

Yaprak ayası ve sapı : Çalışmada, *in vivo* koşullarda yetiştirilen asmalardan aktif vejetasyon döneminde sürgünlerin en uç kısmındaki ilk üç yaprağın ayası ve sapı alınmıştır.

Bu eksplantlar için ayrıca, *in vitro* koşullarda sürgün ucu kültürü ile elde edilen bitkilerin sürgün ucu kısmındaki ilk üç yaprağın ayası ve sapları da kullanılmıştır. Yaprak ayaları yaklaşık 1 cm² büyüklüğünde, saplar ise 1 cm uzunluğunda alınmıştır. Bu eksplantların dikimi 5 yinelemeli olarak gerçekleştirilmiştir. Her yineleme her birinde 3'er eksplant bulunan 3 petriden meydana gelmiştir.

Sülük: *In vivo* koşullarda yetişen ve aktif büyüme döneminde olan asmaların genç sürgünleri üzerindeki ilk üç sülüğün uçlarının 1 cm'lik kısmı kullanılmıştır. Bu eksplantların dikimi de 5 yinelemeli olarak gerçekleştirilmiştir. Her yineleme her birinde 3'er eksplant bulunan 3 petriden meydana gelmiştir.

Olgunlaşmamış zigotik embriyo: Bu eksplant için tam çiçeklenmeden 5-7 hafta sonra (Emershad ve Ramming, 1994; Tangolar ve ark., 1998) oluşan koruklardan çıkartılan tohum taslaklarından izole edilen yaklaşık 1 mm uzunluğundaki embriyolar kullanılmıştır.

Olgun zigotik embriyo: Olgunlaşma zamanında olgun üzümlerden çıkartılan tohumlardan izole edilen 1 mm uzunluğundaki embriyolar kullanılmıştır. Zigotik embriyolarda da dikimler 5 yinelemeli olarak yapılmıştır. Her yinelemede her birinde 5'er eksplant bulunan 2 petri yer almıştır.

3.2.1.2. Organogenesis

Yaprak ayası ve yaprak sapı: *In vitro*'da MS + 1mg/l BA ortamında kültüre alınan boğumlardan elde edilen sürgünlerin MS + 1 mg/l IBA ortamında köklendirilmesiyle elde edilen bitkilerden kesilen yaprak aya ve sapları denemeye alınmıştır. Bu eksplantta her uygulama için 10 yineleme yapılmış ve her yinelemede 3-4 eksplant incelenmiştir.

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu

Anter: %20 'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 20 dakika tutularak sterilizasyon yapılmıştır.

Yaprak ayası: %10'luk sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Yaprak sapı ve sülük : %15'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Olgunlaşmamış ve olgun zigotik embriyo: Bu eksplantlar, %50'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 1 saat süreyle tutularak sterilize edilmiştir.

In vitro koşullardan alınan yaprak ayası ve yaprak sapı kök eksplantlarında sterilizasyon yapılmamış bunlar, doğrudan besin ortamlarına dikilmiştir.

Organogenesis çalışmalarında kullanılan yaprak ayası ve yaprak sapı, *in vitro*'da büyüyen bitkiciklerden alındığı için bunlarda herhangi bir sterilizasyon yapılmayıp ortamlara doğrudan dikimleri yapılmıştır.

3.2.3. Besin Ortamının Hazırlanması

Araştırmada, somatik embriyogenesis ve organogenesis çalışmaları için değişik araştırmacılar tarafından önerilen MS (Murashige ve Skoog, 1962), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ve B5 (Gamborg ve ark., 1968) ortamları kullanılmıştır.

Her bir temel ortam için stok solüsyonlar (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3) hazırlanmış ve ortam hazırlamada bu stok çözeltilerden faydalanılmıştır. Makro ve mikro besin maddeleri, Fe-EDTA ve vitaminlerin hazırlanan stok çözeltileri kullanılabildiği kadar 150 ml'lik cam kavanozlara konularak -20°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır. Bütün ortamlara, ortam hazırlama esnasında myo-inositol, agar ve şeker, eklenmiştir. Tüm ortamlarda pH 5.8'e 1N NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanmış ve ortamlar, otoklavda, 121°C'de, 1 atmosfer basınçta, 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

3.2.4. Kültür Koşulları

Bütün aşamalarda petri kapları içerisindeki eksplantlar ve tüp içerisindeki bitkicikler, sıcaklığı 25±1 °C, fotoperiyodu 16 saat, ışıklandırması 3000-4000 lüks (11000-15000 watt.m⁻²) şiddetinde olan bir büyütme odasında tutulmuştur. Işıklanma Cool-daylight tipi TLD 36 w/54 cool floresan lambalar ile sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. MS temel besin ortamının içeriği

Kimyasallar	Standart ortam konsantrasyonu (mg/l)	Stok çözelti hazırlama katsayısı	Stok çözelti konsantrasyonu (g/l)
MAKRO ELEMENTLER			
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	(x10)	4.4
KNO ₃	1900		19.0
NH ₄ NO ₃	1650		16.5
KH ₂ PO ₄	170		1.7
MgSO ₄ 7H ₂ O	370		3.7
MİKRO ELEMENTLER			
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	(x100)	2.23
H ₃ BO ₃	6.2		0.62
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6		0.86
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.0025
KI	0.83		0.083
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		0.0025
Fe EDTA ELEMENTLERİ			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	(x100)	3.73
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		2.78
VİTAMİNLER			
Glycine	2.0	(x100)	0.2
Nicotinic Acid	0.5		0.05
Thiamine-HCl	0.1		0.01
Pyridoxine-HCl	0.5		0.05
mg/l			
Myo-İnositol	100		
g/l			
Şeker	30		
Agar	8		

Çizelge 3.2. Nitsch ve Nitsch temel besin ortamının içeriği

Kimyasallar	Standart ortam konsantrasyonu (mg/l)	Stok çözelti hazırlama katsayısı	Stok çözelti konsantrasyonu (g/l)
MAKRO ELEMENTLER			
CaCl ₂ .2H ₂ O	223.9	(x10)	2.239
KNO ₃	950		9.5
NH ₄ NO ₃	720		7.2
KH ₂ PO ₄	68		0.68
MgSO ₄ 7H ₂ O	185		1.85
MİKRO ELEMENTLER			
MnSO ₄ .4H ₂ O	25	(x100)	2.5
H ₃ BO ₃	10		1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10		1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.0025
Fe EDTA ELEMENTLERİ			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	(x100)	3.73
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		2.78
VİTAMİNLER			
Glycine	2.00	(x100)	0.200
Nicotinic Acid	5.00		0.500
Thiamine-HCl	0.50		0.050
Pyridoxine-HCl	0.50		0.050
Folic acid	0.50		0.050
Biotin	0.05		0.005
mg/l			
Myo-İnositol	100		
g/l			
Şeker	30		
Agar	8		

Çizelge 3.3. B5 temel besin ortamının içeriği

Kimyasallar	Standart ortam konsantrasyonu (mg/l)	Stok çözelti hazırlama katsayısı	Stok çözelti konsantrasyonu (g/l)
MAKRO ELEMENTLER			
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	(x10)	1.50
KNO ₃	2500		25.0
(NH ₄)SO ₄	134		1.34
NaH ₂ PO ₄	150		1.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	250		2.50
MnSO ₄ .4H ₂ O	10		0.10
MİKRO ELEMENTLER			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	(x100)	0.2
H ₃ BO ₃	3		0.3
KI	0.75		0.075
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.0025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		0.0025
Fe EDTA ELEMENTLERİ			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	(x100)	3.73
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		2.78
VİTAMİNLER			
Nicotinic Acid	1		0.1
Thiamine-HCl	10		1
Pyridoxine-HCl	1		0.1
mg/l			
Myo-Inositol	100		
g/l			
Şeker	30		
Agar	8		

3.2.5. Somatik Embriyogenesis Aşamaları**3.2.5.1. Embriyojenik Kallus Uyartımı**

Çeşitlerin farklı eksplantlarından kallus uyartımını sağlamak için 3 temel besin ortamında 2,4-D'nin 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonları denemeye alınmıştır. Anter eksplantında ise yukarıdaki konsantrasyonlara ek olarak 2,4-D'nin 1 ve 2 mg/l konsantrasyonları, BA'nın 0.1, 0.2 ile 2,4-D'nin 2 ve 4 mg/l konsantrasyonları, BA'nın 1 ve 2 mg/l konsantrasyonlarıyla kombineli olarak denenmiştir. Bu ortamlarda kültüre alınan eksplantlar sürekli karanlık ve fotoperyotu 16/8 saat olan iki ayrı yetiştirme koşulunda tutularak kallus oluşturulmaya çalışılmıştır.

Bu aşamada aşağıdaki özellikler incelenmiştir:

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

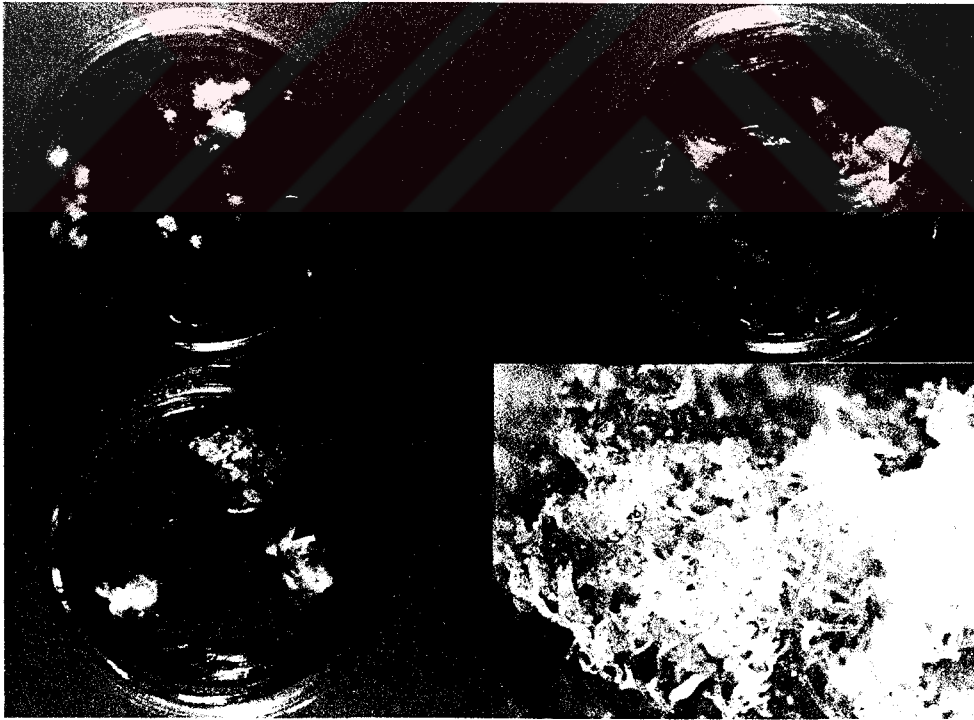
Embriyojenik kallus oranı (%): Bu değer embriyojenik kallus oluşturan eksplant sayısının, kallus oluşturan eksplant sayısına oranlanmasıyla belirlenmiştir. Embriyojenik kallus yığınları sıkı yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklerde olmaları (Büyükalaca, 1993; Hatipoğlu, 1997) ile diğer yığınlardan ayırt edilmiştir. Yapılan mikroskop incelemelerinde, embriyojenik kallus yığınlarında (Şekil 3.3) hücrelerin yuvarlak, küçük, ince hücre duvarlı, sitoplazmaca zengin ve çok sayıda küçük vakuoller ve nişasta daneleleri içerdiği renk ve tip bakımından embriyojenik olmayan gurupta değerlendirilen kallusların ise ince, uzun ve kolay dağılan hücrelerden (Şekil 3.4) meydana geldikleri, unsu yapıda oldukları belirlenmiştir.

Oluşan kallus miktarı (g/eksplant): Her eksplantta oluşan kallus yığınları tek tek tartılarak bulunan toplam kallus ağırlığı eksplant sayısına bölünerek ortalama kallus ağırlığı bulunmuştur.

Kalluslarla ilgili olarak renklerinin, tiplerinin ve derecelerinin dikkate alındığı gözlemlerde aşağıda belirtilen kallus özellikleri incelenmiştir (Büyükalaca, 1993).



Şekil 3.3. Embriyojenik kallus hücreleri



Şekil 3.4. Embriyojenik olmayan kallus ve hücreler

Farklı kallus dereceleri:**Yaprak ayası için;**

0. Kararmış
1. Canlı, hiç kallus yok
2. Yalnızca damar aralarında kallus var
3. Yalnızca damarlar üzerinde kallus var
4. Yalnızca kesim yüzeylerinde kallus var
5. Eksplantın tüm yüzeyinde kallus var

Yaprak sapı ve sülük için;

0. Kararmış
1. Canlı, hiç kallus yok
2. Yalnızca bir uçta kallus var
3. İki uçta kallus var
4. Arada kallus var
5. Eksplantın her tarafında kallus var

Olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantında;

0. Kararmış
1. Canlı, hiç kallus yok
2. < 40 mg
3. 40-480 mg
4. 481-960 mg
5. > 960 mg

Olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantında yukarıda verilen sınıf genişliklerinin saptanması için 2. derecenin en yüksek (40 mg) ve 5. derecenin en düşük (1000 mg) değeri arasındaki ağırlık farkı (960 mg) ikiye bölünmüştür.

Anter eksplantı dışındaki eksplantlarda kallus oluşumu çok fazla olmamıştır. *In vivo* ve *in vitro* yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarından ve sülük eksplantından oluşan kallusların ağırlıkları ortama yerleştirildikten 2 ay sonra

belirlenmiştir. Olgunlaşmamış ve olgun embriyo eksplantında kallus ağırlıkları çok yavaş arttığı için 9 ay sonra tespit edilmiştir.

3.2.5.2. Embriyo Uyartımı

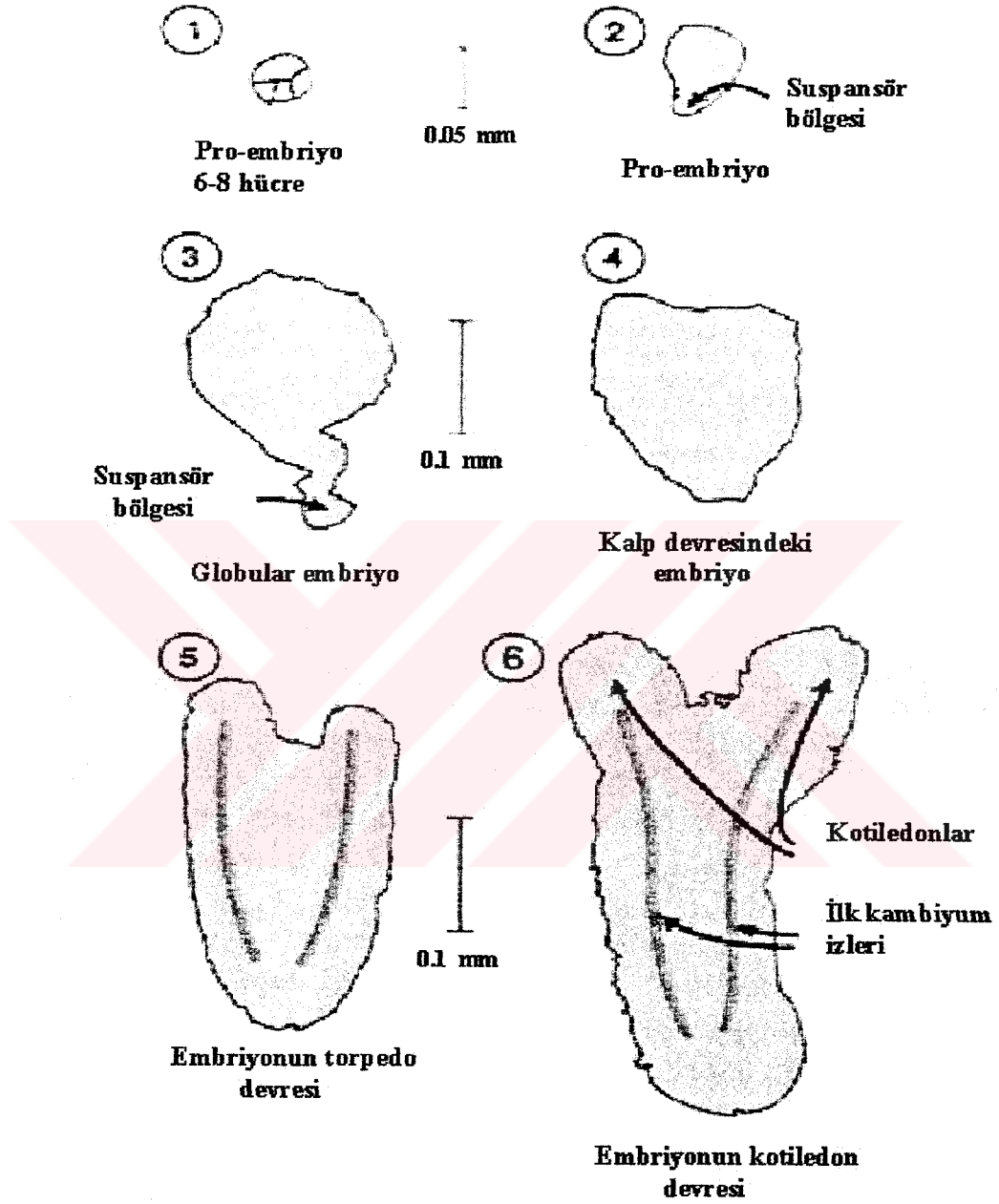
Birinci yıl denemelerinde üç farklı ortama eklenen 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D konsantrasyonlarıyla hazırlanan ortamlara eksplantlar yerleştirilmiş ve ayda bir kez aynı ortamların tazesine iki kez aktarılmalarından sonra gözlemler yapılmıştır. Bunlarda kallus çoğalması fazla olmadığı için aynı ortamın tazesine üç ayda bir yapılmıştır. İkinci üç aylık aktarma sonrasında 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantları üzerinde değişik devrelerde somatik embriyolar görülmeye başlamıştır. Bu devrede somatik embriyolar az sayıda görülmüş olup üçüncü üç ay aktarması sonrasında çok sayıda somatik embriyo belirlenmiştir. Bu dönemde 16/8 fotoperyot ve sürekli karanlık koşullarında bulunan, kallus oluşturup da embriyo oluşturmeyen eksplantlar üç farklı ortamın hormonsuzuna aktarılmış ve bunlar yine aynı koşullara yerleştirilmiştir. İki üç alt kültürden sonra yapılan incelemelerde herhangi bir embriyo oluşumuna rastlanmamıştır.

Kalluslar üzerinde embriyonun torpedo safhasını bulunduranlar binoküler mikroskop altında seçilip embriyonun olduğu ortamın hormonsuzuna aktararak aydınlık koşullara konularak çimlenmeleri sağlanmıştır. Globular ve kalp safhasını oluşturan eksplantlar ½ MS ortamına aktararak aydınlık ve karanlık koşullara konularak embriyoların torpedo safhasına gelmeleri sağlanmıştır. Daha sonra bu embriyolar orijinal ortamlarının hormonsuzuna yerleştirilerek çimlendirilmiştir. İkinci yıl denemesinde birinci yıl denemesi tekrarlanmış ve eksplantlarda oluşan farklı devredeki embriyolar sayılmıştır (Şekil 3.5).

Bu aşamada aşağıdaki özellikler incelenmiştir.

Embriyo oluşturan eksplantların oranı (%): Somatik embriyo oluşumunun herhangi bir devresinde bulunan eksplant sayısının, toplam eksplant sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Kallustan oluşan globular şekilli embriyo sayısı (n): Bu değer, bir eksplantta meydana gelen kallus yığnında oluşan globular devredeki embriyoların sayısıyla bulunmuştur.



Şekil 3.5. Somatik embriyo oluşumunun devreleri (George, 1993)

Kallustan oluşan kalp şekilli embriyo sayısı (n): Bir eksplantta meydana gelen kallus yığnında oluşan kalp devresindeki embriyoların sayımıyla bulunmuştur.

Kallustan oluşan torpedo şekilli embriyo sayısı (n): Bir eksplantta meydana gelen kallus yığnında oluşan torpedo devresindeki embriyoların sayımıyla bulunmuştur.

3.2.5.3. Embriyo Çimlenmesi

Oluşan beyaz renkli 1-3 mm uzunluğundaki somatik embriyolar çimlenmeleri için hormonsuz hazırlanan üç temel besin ortamında kültüre alınmıştır.

Bu aşamadaki kültür sonucunda aşağıdaki özellikler incelenmiştir:

Çimlenen embriyo oranı (%): Çimlenen embriyo sayısının ortama yerleştirilen toplam embriyo sayısına oranıyla bulunmuştur.

Tam bitkiye dönüşme oranı (%): Çimlenen embriyolardan kök ve sürgün oluşturarak bitkiciklere dönüşenler tam bitki olarak nitelendirilmiştir. Bu özellik bitkicik oluşturan embriyoların, toplam çimlenen embriyolara oranıyla belirlenmiştir.

3.2.6. Organogenesis Aşamaları

3.2.6.1. *In Vitro* Sürgünlerin Elde Edilmesi

Bunu için aktif vejetasyon dönemindeki asma sürgünlerinin uç kısımlarındaki odunlaşmamış boğumlar MS + 1mg/l BA bulunan ortamda kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan üç hafta sonra boğumlardaki gözlerin sürmesi ile sürgünler meydana gelmiştir.

3.2.6.2. *In Vitro* Sürgünlerin Çoğaltılması

Üç hafta sürgün büyütme ortamında tutulan boğumlardan elde edilen sürgünler kesilerek aynı ortamın tazesine alınmış ve bu ortamda kardeşlenen sürgünler 3 haftada bir tek tek ayrılarak aynı ortamın tazesinde alt kültüre alınmak suretiyle sürgünlerin çoğaltılması sağlanmıştır.

3.2.6.3. Sürgünlerin Köklendirilmesi

Sürgün çoğaltma ortamından elde edilen sürgünler 1 mg/l IBA içeren MS ortamına dikilerek köklenmeleri sağlanmıştır.

3.2.6.4. Adventif Göz Oluşumu

Köklendirme ortamından elde edilen bitkiciklerden izole edilen yaprak ayaları 1 cm² büyüklüğünde; yaprak sapları ise 1 cm büyüklüğünde kesilerek 1.0 ve 2.0 mg/l BA içeren MS, NN ve B5 ortamlarına dikilmiş ve sıcaklığı 25 ± 1 °C olan aydınlık ve sürekli karanlık kültür koşullarına dikilmiştir. Aydınlıkta ışık yoğunluğu 3000 – 4000 lüks ve fotoperyot 16 saat olarak düzenlenmiştir. Dikimden sonraki 4. haftada eksplantlar üzerinde gerekli gözlemler yapılmış sonra bunlar tekrar aynı hormon konsantrasyonundaki taze ortamlara aktarılmıştır. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra organogenesisin bu aşamasında göz oluşturup da sürgüne dönüşmeyenler aynı ortamın tazesine aktarılmış ve eksplantlarda aşağıdaki gözlemler yapılmıştır:

Kallus oluşturan eksplant oranı (%): Ortama yerleştirilen eksplantlardan kallus oluşturanlar, toplam eksplant sayısına bölünerek kallus oluşum oranı hesaplanmıştır.

Canlılığını kaybeden eksplantların oranı (%): Ortama yerleştirilen eksplantlardan karararak ölenlerin sayısı toplam eksplant sayısına oranlanmıştır.

Adventif göz oluşturan eksplantların oranı (%): Göz oluşturan eksplantların sayısının belirlenip toplam eksplant sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur.

Ortalama adventif göz sayısı (adet/ eksplant): Her eksplantta oluşan adventif gözler sayılmış ve adventif göz oluşturan eksplantlara oranlanmıştır.

3.2.7. Elde Edilen Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Somatik embriyolardan elde edilen ve yeterli miktarda kök ve sürgün oluşturmuş bitkicikleri içeren tüplerin kapakları büyütme odasında aşamalı olarak açılmak suretiyle dış koşullara alıştırma işlemi başlatılmıştır. Bitkicikler tüpten çıkarıldıktan ve agar ile bulaşık kökleri yıkandıktan sonra, mantarlara karşı korumak

amacıyla benomyl içeren çözeltiye bandırılmıştır. Bunlar daha sonra içerisine, 1:1 oranında sterilize edilmiş torf ve perlit karışımı konulmuş plastik saksılara dikilmiş ve iki farklı büyüme ortamına yerleştirilmiştir. Birinci ortamda bitkicikler, yarı gölge bir yere konulup iki üç hafta plastik altında tutularak nemin muhafazasına çalışılmış daha sonra plastik örtü kaldırılarak, doğal ışık koşullarında büyümeleri sağlanmıştır. İkinci koşulda bitkicikler, doku kültürü laboratuvarında bulunan büyüme odasındaki rafa yerleştirilip, nemi muhafaza etmek amacıyla üzerleri plastik ile örtülmüştür. Plastik yaklaşık 15 gün sonra tamamen kaldırılmıştır. Büyütme odasının sıcaklığı 26 ± 2 °C , fotoperiyodu 16 saat, ışıklandırması ise 3000-4000 lükstür.

Dış koşullara alıştırılan bitki oranı (%): Bir ay sonra dış koşullara aktarılan bitkilerden canlı kalanların sayısı, dış koşullara aktarılan toplam bitki sayısına oranlanarak bulunmuştur.

3.2.8. Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi

Somatik bitkilerde somaklonal varyasyonun belirlenmesi amacıyla olgunlaşmamış zigotik embriyolardan elde edilen somatik embriyoların çimlendirilmesiyle oluşan somatik bitkiciklerin kök uçlarında kromozom sayımı yapılmıştır.

Sayımlar için Feulgen yönteminden (Darlington ve La Cour, 1963) yararlanılmıştır. Yöntemde kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları aşağıda sunulmuştur:

Feulgen hazırlanışı : 200 ml saf su kaynatıldıktan sonra içine 1 g Fuchin Basic konulur. Daha sonra bu karışımın sıcaklığı 50 °C'ye kadar düşürülür. Karışımın filtre kağıdından süzülmesinden sonra, soğutulup üzerine 25 ml 1 N HCl asit ilave edilir ve çözelti oda sıcaklığına geldiğinde 1.5 g K₂S₂O₅ konulur ve çözelti karıştırılır. Daha sonra bu çözelti içerisine 0.5 g aktif karbon eklenip tekrar karıştırılıp filtre kağıdıyla süzülerek çözelti hazırlığı tamamlanmıştır.

Asetokarmin hazırlanışı : 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit konulup kaynatılmış ve sonra karışıma 1 g carmin ilave edilmiştir.

Alfabromonaftelin hazırlanışı : Çözelti 100 ml saf su içerisine 4 damla alfabromonaftelin damlatılarak hazırlanmıştır.

Kromozom sayımları için önce deney tüplerinde bulunan somatik bitkicikler tüpten bir pens yardımıyla çıkarılmış ve bitkiciklerin 1 cm'lik kök uçları kesilerek alınmıştır. Daha sonra kökler üzerinde bulunan agar kalıntıları su ile iyice yıkanmıştır. Kökler penisilin şişeleri içinde bulunan alfamonobromonaftalin çözeltisine konarak 5 saat süreyle karanlıkta, oda sıcaklığında tutulmuştur. Bu süre sonunda alfamonobromonaftalin çözeltisi boşaltılmış ve kökler 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Kökler daha sonra yarım saat süreyle glacial asetik asit içinde tutulmuş, sonra glacial asetik asit boşaltılıp, kökler 3 kez saf su ile yıkanmış ve ardından 5 dakika süreyle su içinde bekletilmiştir. Bir filtre kağıdı yardımıyla suyu alınan kökler, 1 N HCl içinde 60°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dakika süreyle hidroliz edilmiştir. Hidroliz edilen kök uçları, 3 kez saf su ile yıkanmış ve Feulgen çözeltisi içinde 1 saat kadar karanlıkta bekletilerek boyanmaları sağlanmıştır. Boyanmadan sonra Feulgen çözeltisi dökülmüş ve kök uçları 10 dakika süreyle çeşme suyu içinde bekletilmiştir. Son olarak kök uçlarının, %1'lik asetokarmin çözeltisi kullanılarak lam ve lamel arasında ezilmesi yoluyla ezme preparatlar hazırlanmıştır.

Bu şekilde hazırlanan örnekler ışık mikroskopunda önce 20x10 ve 40x10 büyütmeyle incelenmiş ve belirlenen kromozomlar 40x10 büyütmeyle immersion yağı da kullanılarak sayılmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

Çalışmada, çimlenen somatik embriyolardan bitkicik elde edilmesi aşamasında ve organogenesiste *in vitro* sürgünlerin elde edilmesi ve köklendirilmesinde 15 cm uzunluğundaki sigma kültür tüpü, bunun dışındaki tüm aşamalarda 60x15 mm lik cam petriler kullanılmıştır.

Uygulamalardan elde edilen verilerin ortalamaları çizelgelerde standart hatalarıyla birlikte verilmiştir.

4. BULGULAR

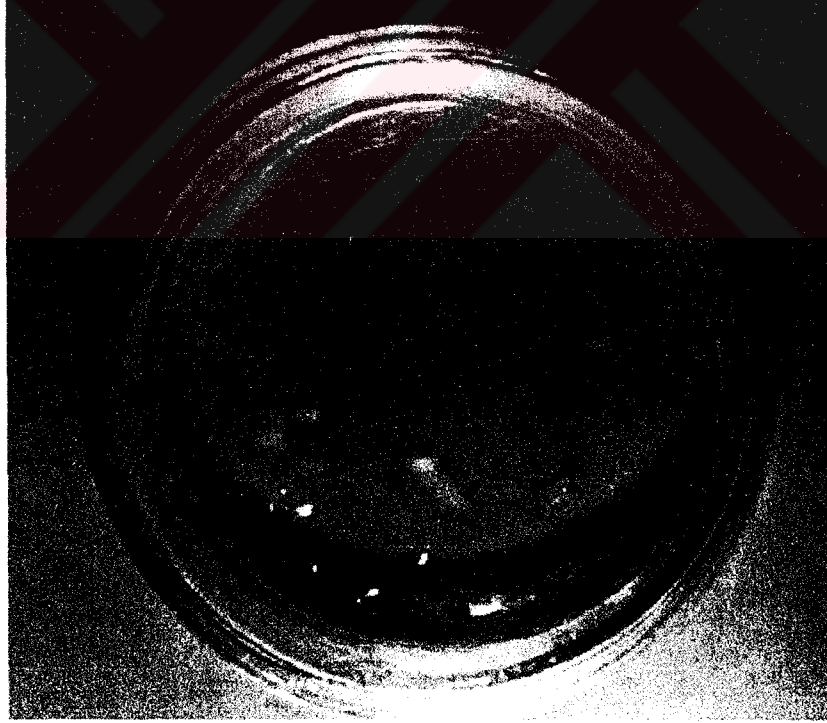
4.1. Somatik Embriyogenesis Bulguları

4.1.1. Anter Eksplantından Elde Edilen Bulgular

4.1.1.1. 41 B

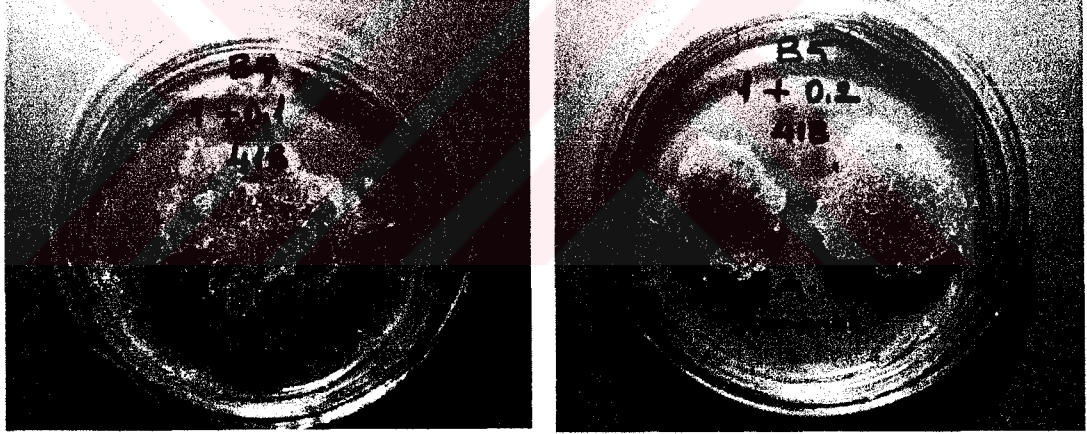
4.1.1.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı

Denemenin birinci yılında, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l 2,4-D içeren MS, NN ve B5 ortamlarına yerleştirilip aydınlık ve karanlık olan iki ayrı büyüme ortamında kültüre alınan 41 B anacı anterlerinde herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiş ve eksplantlar 1-2 ay içinde kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir (Şekil 4.1). İkinci yıl ise 2,4-D'nin 1 ve 2 mg/l konsantrasyonu, BA'nın 0.1 ve 0.2 mg/l konsantrasyonu ile birlikte kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen değerler Çizelge 4.1. de verilmiştir.



Şekil 4.1. 2,4-D'nin tek başına kullanıldığı ortamlarda canlılığını kaybeden anterler

Çizelgeden de görülebileceği gibi denemede kullanılan bütün besin ortamlarında 2,4-D + BA'nın tüm konsantrasyonlarının karanlık uygulamalarında, aydınlıktan daha yüksek değerler elde edilmiştir. NN'in bütün konsantrasyonlarının aydınlık kültürlerinde kallus oluşturan eksplant görülmemiştir. MS ortamında ise yalnızca 1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l BA konsantrasyonunun, aydınlık uygulaması yapılan eksplantlarında %4.4 oranında kallus oluşmuştur. Aydınlık uygulaması, B5 ortamının bütün konsantrasyonlarında %2.0 - %4.0 arasında değişen oranlarda kallus oluşumunu sağlamıştır. 2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l BA eklenen MS ile NN ortamlarındaki aydınlık ve karanlık kültürlerde kallus oluşmamıştır. Karanlıkta tutulan B5 ortamında kullanılan bütün hormon konsantrasyonlarında %27.5 (1 mg/l 2,4-D + 0.1mg/l BA) ile %70.0 (1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l BA) arasında değişen oranlarda kallus oluşumu gerçekleşmiş olup, bu değerler diğer ortamlardaki karanlık uygulaması değerlerinden oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 1 mg/l 2,4-D + 0.1 ve 0.2 mg/l BA eklenen B5 ortamının karanlık kültürlerindeki anterlerde kallus oluşumu

41 B anacı anterlerinden değişik ortam ve hormon konsantrasyonları ile aydınlık ve karanlık koşullarda elde edilen kallusların tamamının (%100) embriyojenik kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Denemenin üçüncü yılında da, en yüksek oranda kallusun karanlıkta tutulan eksplantlardan elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. 41 B anacı anter eksplantlarının değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (1999 yılı)

Besi Ortamı	2,4-D + BA mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus oranı (%)
MS	1 + 0.1	Aydınlık	0	0
		Karanlık	2.0 ± 2.0	100
	1 + 0.2	Aydınlık	4.4 ± 2.9	100
		Karanlık	12.0 ± 5.4	100
	2 + 0.1	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	2 + 0.2	Aydınlık	0	0
		Karanlık	14.0 ± 7.3	100
NN	1 + 0.1	Aydınlık	0	0
		Karanlık	18.0 ± 4.7	100
	1 + 0.2	Aydınlık	0	0
		Karanlık	26.0 ± 5.2	100
	2 + 0.1	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	2 + 0.2	Aydınlık	0	0
		Karanlık	4.0 ± 2.7	100
B5	1 + 0.1	Aydınlık	4.0 ± 4.0	100
		Karanlık	27.5 ± 9.2	100
	1 + 0.2	Aydınlık	2.5 ± 2.5	100
		Karanlık	70.0 ± 5.4	100
	2 + 0.1	Aydınlık	2.2 ± 2.2	100
		Karanlık	37.8 ± 12.2	100
	2 + 0.2	Aydınlık	2.0 ± 2.0	100
		Karanlık	33.3 ± 9.4	100

Aydınlık koşullardaki MS ortamında 2 + 1 (2,4-D + BA) kombinasyonunda eksplantların %5.1'i, 4 + 2 (2,4-D + BA) de ise eksplantların %3.0'ü kallus oluşturmuştur. NN ortamının aydınlıktaki kültürlerinde 2 + 1 hormon kombinasyonunda eksplantlar kallus oluşturamamış, 4 + 2 kombinasyonunda %5.7 oranında kallus meydana getirmişlerdir. Aydınlık uygulamalarında en yüksek değerler B5 ortamlarından elde edilmiştir. 2 + 1 ve 4 + 2'de kallus oluşumları birbirine çok yakın değerler vermiştir (sırasıyla %26.4, %27.6). Karanlık uygulamalarında da en yüksek oranlar yine B5 ortamlarında saptanmıştır. 2 + 1 kombinasyonu %73.1 ile en fazla kallus oluşturan eksplant oranına sahip olmuş, 4 + 2'de de %61.1 oranında bir değer elde edilmiştir. MS ortamının NN ortamından daha üstün değerler verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. 41 B anacı anter eksplantlarının değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (2000 yılı)

Besi Ortamı	2,4-D + BA mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus oranı (%)
MS	2 + 1	Aydınlık	5.1 ± 3.8	100
		Karanlık	7.7 ± 3.7	100
	4 + 2	Aydınlık	3.0 ± 1.9	100
		Karanlık	26.5 ± 3.1	100
NN	2 + 1	Aydınlık	0	0
		Karanlık	9.7 ± 3.9	100
	4 + 2	Aydınlık	5.7 ± 3.0	100
		Karanlık	7.1 ± 4.8	100
B5	2 + 1	Aydınlık	26.4 ± 6.5	100
		Karanlık	73.1 ± 7.2	100
	4 + 2	Aydınlık	27.6 ± 4.7	100
		Karanlık	61.1 ± 8.5	100

B5 ortamının değişik hormon ve konsantrasyonlarında kültüre alınan 41 B anacı anterlerinden elde edilen 1 g yaş kallustan 4 hafta içinde farklı kombinasyonlarda birbirine oldukça yakın ağırlıkta (3.1 – 3.7 g arasında) kallus oluşmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. 41 B anterlerinden elde edilen 1 g (yaş) kallustan 2,4-D ve BA'nın farklı kombinasyonlarını içeren B5 ortamında ve karanlık koşullarda 4 hafta sonra meydana gelen kallus miktarları

2,4-D + BA (mg/l)	Kallus ağırlığı (g)
1 + 0.1	3.5 ± 0.2
1 + 0.2	3.7 ± 0.2
2 + 0.1	3.1 ± 0.7
2 + 0.2	3.1 ± 0.5

4.1.1.1.(2). Embriyo Uyartımı

İkinci ve üçüncü yıllarda, farklı ortamlarda, farklı hormon konsantrasyonu kombinasyonlarında, aydınlık ve karanlık koşullarda elde edilen embriyojenik kapasitedeki kalluslar oluştukları ilk ortamın hormonsuzuna yerleştirilmiş ve ayda bir olmak üzere 3 kez alt kültüre alınmıştır. Bu süre sonunda kalluslarda herhangi bir embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Daha sonra kalluslar **Salunkhe ve ark. (1999)**'nın önerdiği 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA içeren NN ortamına ve ayrıca 2 mg/l NAA + 0.5 ve 1 mg/l BA içeren NN ortamına da konulmuş ve bunlar ayda bir olmak üzere üç kez alt kültüre alınmıştır. Bu kombinasyonlara yerleştirilen kalluslardan aydınlıktakiler aydınlık, karanlıktakiler ise karanlık koşullara konulmuştur. Karanlık koşullarda üç ay sonra 2 mg/l NAA + 2 mg/l BA içeren NN ortamına yerleştirilmiş kallusların 10 petrisinden üç tanesinde globular ve kalp aşamasında embriyolar gözlenmiş, bunlar hormonsuz taze ortama aktarıldığında kökçükler oluşmuş ancak, bitkiciğe dönüşememişlerdir. Bu deneme daha sonra tekrarlandığında kalluslardan embriyo oluşmamıştır. Bu durumun muhtemelen kallusları çoğaltmak amacıyla çok

fazla alt kültür kullanılması nedeniyle embriyo uyartımını sağlayacak rejenerasyon yeteneğinin azalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

4.1.1.2. Yalova İncisi

Birinci yıl, 2,4-D'nin 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonları eklenerek hazırlanan MS, NN ve B5 ortamlarına yerleştirilen Yalova İncisi anterleri, yaklaşık 1-2 ay sonra tutuldukları tüm ortam ve hormon konsantrasyonlarında (hem aydınlık hem de karanlık koşullarda) kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir.

İkinci yıl MS, NN ve B5 ortamına 2,4-D'nin 1 ve 2 mg/l konsantrasyonları ile BA'nın 0.1 ve 0.2 mg/l konsantrasyonları birlikte eklenmiştir. Bu ortamlarda hem aydınlık hem de karanlık koşullarda kültüre alınan anterlerden kallus elde edilememiştir.

Üçüncü yıl MS, NN ve B5 ortamına 2,4-D'nin 2 ve 4 mg/l konsantrasyonları ile BA'nın 1 ve 2 mg/l konsantrasyonları birlikte eklenmiş ve bu ortamlara yerleştirilen anterler aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Karanlık koşullarda, 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA içeren B5 ortamında, kültüre alınan anterlerin % 4.17'sinde ve 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BA bulunan NN ortamına yerleştirilen anterlerden %1.52'sinde kallus oluşmuştur. Oluşan kallusların %100'ünün embriyojenik kapasiteye sahip olduğu saptanmıştır.

Elde edilen kalluslar başlangıç ortamların hormonsuzuna yerleştirilmiş ve kallusların elde edildiği karanlık koşullarda kültüre alınmış ancak bunlarda herhangi bir embriyo oluşumuna rastlanmamıştır.

4.1.2. Yaprak Ayası Eksplantından Elde Edilen Bulgular

4.1.2.1. *In Vivo* Bulgular

4.1.2.1.(1). 41 B

4.1.2.1.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı

41 B anacının *in vivo*'da yetişen bitkilerinden alınan yaprak eksplantlarından MS ortamında yalnızca 4 mg/l 2,4-D bulunan aydınlık kültürlerde %20 oranında kallus elde edilebilmiştir. NN ve B5 ortamlarında ise farklı uygulamalardan değişik

oranlarda kallus elde edilmiştir. NN ortamında en yüksek kallus oluşumu (%100) 2 mg/l 2,4-D bulunan karanlık kültürlerde saptanmıştır. B5 ortamında ise 1 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde kallus oluşturan eksplant oranı %100 bulunmuştur. B5 ortamının karanlık kültürleri aydınlıktan daha iyi sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6).

Kallus oluşum derecelerine ilişkin oranlar incelendiğinde MS + 1 mg/l 2,4-D'nin karanlık (%87.5) ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık (%80) uygulamaları dışındaki tüm uygulamalarda eksplantların tamamı (%100) karararak (0 derece) canlılıklarını kaybetmişlerdir. NN ve B5 ortamlarında kararır MS ortamına göre çok daha az olmuştur. NN ortamında kararır oranı %0 ile %66.7, B5 ortamında ise %0 ile %58.4 arasında değişmiştir. 1mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının karanlık uygulamalarında ise eksplantların %12.5'i kallus oluşturmamıştır (1 derece). NN ortamında tüm 2,4-D konsantrasyonlarının yalnızca aydınlık kültürlerinde eksplantların %8.3 ile %41.7'sinde, B5 ortamında ise 4 mg/l 2,4-D bulunan karanlık kültürleri dışındaki tüm aydınlık uygulamalarında %52.2 ile %66.7 arasında değişen oranlarda eksplantlar canlı olmalarına karşın kallus oluşturmamışlardır. Denemede kullanılan tüm uygulamalarda 2 dereceli kallus oluşumu meydana gelmemiştir. Üç dereceli kallus oluşumu MS ortamında yalnızca 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürlerinde %20 oranında, en yüksek üç dereceli kallus oluşumunun (%75) NN ortamında 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürlerinde, B5 ortamında ise 2 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde (%33.4) olduğu tespit edilmiştir. Dört dereceli kallus oluşumu MS ortamının hiçbir uygulamasında görülmemiştir. NN ortamında %8.3 – %66.7, B5 ortamında %5.6 - %45.8 arasında değişen oranlarda 4 dereceli kallus oluşumu meydana gelmiştir. Beş dereceli kallus oluşumunun yalnızca 2 ve 4 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamının karanlık kültürlerinde, B5 ortamında ise 1 ve 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde gerçekleştiği saptanmıştır. NN ve B5 ortamından elde edilen kallusların genelde 3 ve 4 dereceli kalluslar olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6).

MS ortamında yalnızca bir uygulamadan elde edilen kallusların da embriyojenik olmadığı tespit edilmiştir. NN ve B5 ortamından elde edilen kallusların uygulamalara göre değişen oranlarda embriyojenik olduğu ve bu oranların da NN ortamında %25 ile %100, B5 ortamında ise %0 ile %91.7 arasında değiştiği bulunmuştur (Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6).

Çizelge 4.4. 41 B Amerikan asma anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
				0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	0	100	0	0	0	0	0	0
		Karanlık	0	100	0	0	0	0	0	0
	1.0	Aydınlık	0	100	0	0	0	0	0	0
		Karanlık	0	87.5 ± 12.4	12.5 ± 12.5	0	0	0	0	0
	2.0	Aydınlık	0	100	0	0	0	0	0	0
		Karanlık	0	100	0	0	0	0	0	0
	4.0	Aydınlık	20.0 ± 11.5	80.0 ± 11.5	0	0	20.0 ± 11.5	0	0	0
		Karanlık	0	100	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.5. 41 B Amerikan asma anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
				0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	75.0 ± 24.7	16.7 ± 16.7	8.3 ± 8.3	0	41.7 ± 30.1	33.3 ± 22.1	0	41.7 ± 21.7
		Karanlık	33.3 ± 0	66.7 ± 0	0	0	0	33.3 ± 0	0	100
	1.0	Aydınlık	75.0 ± 13.0	0	37.5 ± 10.8	0	58.3 ± 6.7	8.3 ± 8.1	0	72.2 ± 16.7
		Karanlık	66.7 ± 0	33.0 ± 0	0	0	33.3 ± 0	33.3 ± 0	0	83.4 ± 17.7
	2.0	Aydınlık	50.0 ± 25.0	8.3 ± 8.3	41.7 ± 21.9	0	33.3 ± 22.0	16.7 ± 8.3	0	75.0 ± 13.0
		Karanlık	100	0	0	0	16.7 ± 16.7	66.7 ± 33.3	16.7 ± 16.7	83.4 ± 17.7
	4.0	Aydınlık	83.3 ± 9.6	0	16.7 ± 9.6	0	75.0 ± 4.3	8.3 ± 8.3	0	25.0 ± 25.0
		Karanlık	70.8 ± 23.9	29.2 ± 23.9	0	0	10 ± 10	47.5 ± 20.6	5.0 ± 5.0	100

Çizelge 4.6. 41 B Amerikan asma anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ve farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
				0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	41.7 ± 21.7	0	58.3 ± 23.6	0	16.7 ± 16.7	25.0 ± 25.0	0	37.5 ± 37.5
		Karanlık	41.7 ± 8.4	58.4 ± 8.4	0	0	25.0 ± 25.0	16.7 ± 16.7	0	90.0 ± 10.0
	1.0	Aydınlık	40.0 ± 40.0	0	60.0 ± 40.0	0	20.0 ± 20.0	20.0 ± 20.0	0	0
		Karanlık	100	0	0	0	12.5 ± 12.5	10 ± 10	77.5 ± 2.5	45.9 ± 29.2
	2.0	Aydınlık	33.3 ± 9.6	0	66.7 ± 7.7	0	27.8 ± 4.8	5.6 ± 5.6	0	33.3 ± 33.3
		Karanlık	95.8 ± 4.8	20.9 ± 10.5	0	0	33.4 ± 11.8	45.8 ± 14.2	0	91.7 ± 4.6
	4.0	Aydınlık	47.8 ± 8.3	0	52.2 ± 9.0	0	22.2 ± 14.7	38.4 ± 17.7	0	72.2 ± 16.7
		Karanlık	66.7 ± 16.7	25.0 ± 8.3	8.4 ± 8.4	0	0	16.7 ± 0	50.0 ± 16.7	91.7 ± 8.4

4.1.2.1.(1).(b). Embriyo Uyarımı

MS, NN ve B5 ortamlarının farklı uygulamalarından elde edilen embriyojenik kalluslar aynı ortamların hormonsuzuna aktarıldığında somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

4.1.2.1.(2). Yalova İncisi**4.1.2.1.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyarımı**

Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vivo*'da yetiştirilen bitkilerinden alınan yaprak eksplantlarının denemede kullanılan farklı uygulamalarda gösterdikleri tepkilere ilişkin bulgular **Çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9**'da verilmiştir.

Denemede kullanılan bütün uygulamalarda en yüksek oranda kallus oluşumu (%100) 2 mg/l 2,4-D eklenen NN ortamında aydınlık koşullarında, en düşük oran (%8.4) ise 4 mg/l 2,4-D içeren NN ortamında karanlık koşullarda kültüre alınan eksplantlarda gözlenmiştir.

Kallus ağırlığı değerlerine bakıldığında 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D bulunan MS ve NN ortamlarının karanlığında bu uygulamanın aydınlığından daha yüksek, 2 ve 4 mg/l 2,4-D' lilerde ise aydınlıkta tutulan eksplantlarda karanlığa göre daha yüksek miktarda kallus oluşumu sağlanmıştır. En yüksek kallus ağırlığı MS ortamında 456.8 mg (4 mg/l 2,4-D + aydınlık), NN ortamında 125.6 mg (0.5 mg/l 2,4-D + karanlık) olarak tespit edilmiştir.

B5 ortamında, karanlıktaki eksplantlar aydınlıktakilere göre daha yüksek miktarda kallus oluşturmuşlardır. B5 ortamında en yüksek kallus ağırlığı 158.6 mg (2 mg/l 2,4-D + karanlık), en düşük kallus ağırlığı ise 3.4 mg olarak (4 mg/l 2,4-D + aydınlık) olarak kaydedilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından genel olarak MS ortamındaki kallus yığınlarının NN ve B5 ortamlarından daha ağır çıktığı görülmüştür.

Farklı derecelerde kallus oluşturma oranları incelendiğinde MS ortamının aydınlık uygulamalarındaki eksplantlar 2,4-D konsantrasyonlarına göre %50.0-%73.3 arasında değişen oranlarda canlılıklarını kaybetmişlerdir (0 derece). NN ortamında canlılığını kaybeden eksplantlar %0 ile %43.3 arasında değişen oranlarda

ortaya çıkmıştır. B5 ortamında ise yalnızca 2 ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürlerinde (sırasıyla %16.7 ve %4.2) eksplantların canlılıklarını kaybettikleri görülmüştür. MS ve NN ortamlarının genelde tüm karanlık uygulamalarındaki eksplantlar 2,4-D konsantrasyonlarına göre değişen oranlarda canlı olmalarına karşın kallus oluşturamamışlardır. B5 ortamında ise hem aydınlık hem de karanlık kültürlerdeki eksplantlar uygulamalara göre değişmek üzere değişik oranlarda kallus meydana getirmemişlerdir (1 derece).

Denemede kullanılan tüm uygulamalarda iki dereceli kallus oluşumu görülmemiştir. Kullanılan tüm ortam ve hormon konsantrasyonlarında genelde 3 ve 4 dereceli kallus oluşumunun olduğu görülmektedir. 3 dereceli kallus oluşumu MS ortamında yalnızca 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık (%5.6) ve karanlık (%6.7) koşullarında ortaya çıkmıştır. NN ve B5 ortamında aydınlık uygulamaları karanlık uygulamalardan daha yüksek değerler vermiştir. Beş dereceli kallus oluşumu yalnızca MS ortamında, bu ortamda da 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D + karanlık kültürlerinde %16.7, 2 ve 4 mg/l 2,4-D + karanlık kültürlerinde %6.7 oranında meydana gelmiştir. Genel olarak tüm uygulamalardaki eksplantlar 3 ve 4 dereceli kallus oluşturmuşlardır.

Embriyojenik kallus oranı bakımından en iyi sonuç MS ortamına eklenen tüm 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamalarından (%100) alınmıştır. NN ortamında bu oran ise %83.3 ile %100, B5 de ise %50 ile %100 arasında değişmiştir.

4.1.2.1.(2).(b). Embriyo Uyartımı

Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vivo*'dan alınan yaprak eksplantları farklı besi ortamı, 2,4-D konsantrasyonu ve büyütme koşullarından elde edilen embriyojenik kalluslar aynı besi ortamlarının hormonsuzuna yerleştirildiğinde herhangi bir somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.7 . Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	38.9 ± 20.0	142.2 ± 83.9	61.1 ± 20.0	0	0	0	38.9 ± 20.0	0	100
		Karanlık	83.3 ± 9.6	242.4 ± 103.0	16.7 ± 9.6	0	0	0	66.7 ± 9.6	16.7 ± 9.6	100
	1.0	Aydınlık	26.7 ± 11.3	300.8 ± 156.7	73.3 ± 11.3	0	0	0	26.7 ± 11.3	0	100
		Karanlık	44.5 ± 14.6	362.8 ± 129.8	0	55.5 ± 14.6	0	0	27.8 ± 14.6	16.7 ± 0	100
	2.0	Aydınlık	40.0 ± 17.2	411.8 ± 213.6	60.0 ± 17.2	0	0	0	40.0 ± 17.2	0	100
		Karanlık	66.7 ± 19.0	109.2 ± 71.3	0	33.3 ± 19.0	0	0	60.0 ± 18.7	6.7 ± 6.7	100
	4.0	Aydınlık	50.0 ± 18.3	456.8 ± 163.4	50.0 ± 18.3	0	0	0	44.4 ± 17.0	0	100
		Karanlık	40.0 ± 17.2	219.6 ± 136.5	0	60.0 ± 16.1	0	6.7 ± 4.1	26.7 ± 15.4	6.7 ± 6.7	100

Çizelge 4.8 . Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	73.3 ± 6.7	113.8 ± 15.8	26.7 ± 6.7	0	0	46.7 ± 13.3	26.7 ± 10.0	0	96.7 ± 3.3
		Karanlık	20.8 ± 12.5	125.6 ± 65.2	0	79.2 ± 11.9	0	12.5 ± 8.1	8.3 ± 8.3	0	100
	1.0	Aydınlık	56.7 ± 18.0	72.8 ± 17.9	43.3 ± 18.0	0	0	33.3 ± 11.8	23.3 ± 10.0	0	93.3 ± 6.7
		Karanlık	16.7 ± 9.6	103.2 ± 55.8	4.2 ± 4.2	79.2 ± 12.5	0	8.3 ± 4.8	8.3 ± 4.8	0	83.3 ± 16.7
	2.0	Aydınlık	100	81.0 ± 14.1	0	0	0	86.7 ± 9.7	13.3 ± 9.7	0	86.7 ± 9.7
		Karanlık	29.2 ± 10.5	52.4 ± 24.4	25.0 ± 4.8	45.9 ± 10.5	0	29.2 ± 10.5	0	0	100
	4.0	Aydınlık	79.3 ± 12.2	75.0 ± 11.1	20.7 ± 12.2	0	0	62.0 ± 12.2	17.4 ± 0.7	0	100
		Karanlık	8.4 ± 4.8	41.6 ± 15.1	25.0 ± 16.0	66.7 ± 11.8	0	0	8.4 ± 4.8	0	100

Çizelge 4.9 . Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	37.5 ± 15.0	15.2 ± 7.4	0	62.5 ± 15.6	0	16.7 ± 11.7	20.8 ± 8.3	0	66.7 ± 6.7
		Karanlık	94.4 ± 5.5	127.8 ± 30.9	0	5.6 ± 5.6	0	0	94.4 ± 5.6	0	100
	1.0	Aydınlık	37.5 ± 7.5	17.4 ± 12.1	0	62.5 ± 9.4	0	25.0 ± 11.3	12.5 ± 12.5	0	50.0 ± 22.5
		Karanlık	66.7 ± 27.0	92.0 ± 32.1	0	33.3 ± 25.0	0	0	66.7 ± 25.4	0	100
	2.0	Aydınlık	45.9 ± 10.5	22.4 ± 8.9	16.7 ± 6.7	37.5 ± 13.1	0	41.7 ± 14.6	4.2 ± 4.2	0	60.4 ± 15.1
		Karanlık	50.0 ± 7.5	158.6 ± 49.6	0	50.0 ± 7.5	0	12.5 ± 12.5	37.5 ± 14.2	0	100
	4.0	Aydınlık	45.8 ± 16.0	3.4 ± 2.1	4.2 ± 4.2	50.0 ± 20.0	0	45.8 ± 16.0	0	0	56.0 ± 25.2
		Karanlık	41.7 ± 4.2	73.0 ± 19.3	0	58.4 ± 5.8	0	12.5 ± 8.0	29.2 ± 4.2	0	100

4.1.2.2. *In Vitro* Bulguları

4.1.2.2.(1). 41 B

4.1.2.2.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı

41 B Amerikan asma anacının *in vitro*'da yetiştirilen bitkiciklerinden alınan yaprak eksplantlarının dört farklı 2,4-D konsantrasyonunu içeren üç ortamda aydınlık ve karanlık kültürlerinden elde edilen bulguları **Çizelge 4.10, 4.11 ve 4.12**'de sunulmuştur. Buna göre çoğu uygulamalarda, kültüre alınan eksplantların tamamı (%100) veya tamamına yakını kallus oluşturmuştur. Bu özellik bakımından en düşük değer (%66.7) aydınlık koşullarda tutulan 0.5 mg/l 2,4-D ekli NN ortamından elde edilmiştir. Kallus ağırlığı yönünden bakıldığında NN + 0.5 mg/l 2,4-D ortamı ayrı tutulacak olursa bütün uygulamalarda karanlıktaki eksplantlar aydınlıktakilere göre daha yüksek miktarda kallus oluşturmuştur. Kallus miktarları 36.1 mg (NN + 1 mg/l 2,4-D'nin aydınlığı) ile 322.3 mg (B5 + 2 mg/l 2,4-D'in karanlığı) arasında değişmiştir. Denemedeki tüm uygulamalarda canlılığını kaybeden (0 derece) eksplant bulunmamıştır. Canlı olmasına karşın kallus oluşturmayan eksplantlar (1 derece) MS ve NN ortamlarına eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlığında (sırasıyla %5.6 ve %33.3) ve MS + 1 ve 2 mg/l 2,4-D'nin karanlığında (sırasıyla %16.7 ve %6.7) gözlenmiştir. B5 ortamında ise 2 mg/l 2,4-D'nin aydınlığında (%25.0) ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık (%11.1) ve karanlık koşullarında (%5.6) saptanmıştır. İki dereceli kallus oluşumu görülmemiştir. Üç dereceli kallus oluşumu, MS ortamına eklenen farklı 2,4-D konsantrasyonlarında aydınlık kültürlerde karanlıktakilere kıyasla çok daha yüksek oranda meydana gelmiştir. MS'e eklenen 1 ve 2 mg/l 2,4-D ve NN'e eklenen 1 , 2 ve 4 mg/l 2,4-D ile B5'in 1 mg/l 2,4-D bulunduran uygulamalarının aydınlık koşullarındaki bütün eksplantlarda %100 oranında 3 dereceli kallus oluşumu tespit edilmiştir. Dört dereceli kallus oluşumu NN + 0.5 mg/l 2,4-D (%5.6) ile B5 + 2 ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürlerinde sırasıyla, %33.4 ve %5.6 oranında görülmüştür. Beş dereceli kallus oluşturan eksplantlar incelendiğinde bunların aydınlıkta yalnızca MS + 4 mg/l 2,4-D ve B5 + 0.5 mg/l 2,4-D uygulamalarında, denemede kullanılan tüm uygulamaların karanlığında değişik oranlarda meydana gelmiştir. B5 + 1 mg/l 2,4-D'in karanlık uygulamasında %100 oranında 5 dereceli

kallus oluşumu saptanmıştır. Farklı kallus dereceleri birlikte incelendiğinde eksplantların genelde 3 ve 5 dereceli kallus oluşturduğu görülmektedir.

B5 ve NN + 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlığında (sırasıyla %83.3 ve %76.7) ve B5 + 4 mg/l 2,4-D ortamının aydınlık (%40.0) ve karanlık (%66.7) kültürleri dışında denemede kullanılan bütün ortamlarda oluşan kallusların %100'ünün embriyojenik özellikte olduğu belirlenmiştir.

4.1.2.2.(1).(b). Embriyo Uyartımı

Farklı uygulamalardan elde edilen embriyojenik kalluslar oluştukları ortamın hormonsuzuna aktarıldığında herhangi bir somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.10. 41 B Amerikan asma anacından *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	94.4 ± 5.5	62.6 ± 25.3	0	5.6 ± 5.6	0	94.4 ± 5.5	0	0	100
		Karanlık	100	129.1 ± 22.4	0	0	0	26.7 ± 17.0	0	73.3 ± 16.9	100
	1.0	Aydınlık	100	148.7 ± 85.9	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	83.3 ± 14.4	162.5 ± 18.1	0	16.7 ± 16.7	0	44.4 ± 7.7	0	38.9 ± 13.5	100
	2.0	Aydınlık	100	69.7 ± 16.1	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	93.3 ± 5.4	155.1 ± 17.9	0	6.7 ± 6.7	0	0	0	93.3 ± 5.4	100
	4.0	Aydınlık	100	91.7 ± 10.6	0	0	0	88.9 ± 10.3	0	11.1 ± 10.9	100
		Karanlık	100	178.3 ± 20.6	0	0	0	22.2 ± 21.8	0	77.8 ± 22.5	100

Çizelge 4.11. 41 B Amerikan asma anacından *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	66.7 ± 7.7	64.9 ± 18.7	0	33.3 ± 9.6	0	61.1 ± 7.1	5.6 ± 5.6	0	83.3 ± 14.4
		Karanlık	100	57.9 ± 10.0	0	0	0	80.0 ± 18.5	0	20.0 ± 19.6	100
	1.0	Aydınlık	100	36.1 ± 4.2	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	100	82.3 ± 23.8	0	0	0	50.0 ± 28.9	0	50.0 ± 28.9	100
	2.0	Aydınlık	100	51.7 ± 6.0	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	100	132.7 ± 15.3	0	0	0	53.3 ± 27.7	0	46.7 ± 27.0	100
	4.0	Aydınlık	100	62.4 ± 10.8	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	100	153.3 ± 8.9	0	0	0	40.0 ± 11.5	0	60.0 ± 10.4	100

Çizelge 4.12. 41 B Amerikan asma anacından *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	100	155.9 ± 72.0	0	0	0	80.0 ± 18.5	0	20.0 ± 19.6	76.7 ± 13.3
		Karanlık	100	160.0 ± 27.7	0	0	0	33.3 ± 32.7	0	66.7 ± 34.7	100
	1.0	Aydınlık	100	119.0 ± 13.7	0	0	0	100	0	0	100
		Karanlık	100	266.4 ± 61.5	0	0	0	0	0	100	100
	2.0	Aydınlık	75.0 ± 26.5	210.7 ± 14.9	0	25.0 ± 24.7	0	41.7 ± 41.3	33.4 ± 16.5	0	100
		Karanlık	100	322.3 ± 55.8	0	0	0	20.0 ± 11.5	0	80.0 ± 13.9	100
	4.0	Aydınlık	88.9 ± 5.1	1226 ± 42.5	0	11.1 ± 5.8	0	83.3 ± 9.6	5.6 ± 5.5	0	40.0 ± 30.0
		Karanlık	94.4 ± 5.5	202.5 ± 70.1	0	5.6 ± 5.5	0	38.9 ± 22.5	0	55.5 ± 28.8	66.7 ± 34.7

4.1.1.1.(2). Yalova İncisi

4.1.1.1.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı

Çizelge 4.13, 4.14 ve 4.15’de görüldüğü gibi Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vitro* yaprak eksplantlarından kallus oluşturma oranları ortamlara göre çok az farklılık göstermiştir. 1 mg/l 2,4-D’li MS ortamı karanlık uygulaması (kallus oranı %87.5) dışında diğer 2,4-D konsantrasyonlarında karanlık koşullardaki kallus oluşumu %100 oranında gerçekleşmiştir. Aydınlıkta ise kallus oranı %62.5 ile %100 arasında değişmiştir. NN ortamında 0.5 mg/l 2,4-D konsantrasyonundaki aydınlık uygulamasında %77.5 oranında; diğer konsantrasyonların aydınlık uygulamalarında ise %100 oranında kallus oluşarak karanlık koşullara göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bütün B5 + 2,4-D ortamlarının hem aydınlık hem de karanlık uygulamalarında kallus oluşumu oldukça yüksek oranlarda (%80 - %100) gerçekleşmiştir.

Kallus ağırlıkları incelendiğinde en ağır kallus yığınlarının genel olarak B5 ortamından elde edildiği görülmektedir. B5 ortamındaki karanlık kültüre alınan eksplantlarda kallus ağırlığı aydınlıktakilere göre daha fazla miktarda oluşmuştur. B5 ortamında elde edilen en yüksek kallus ağırlığı 198.5 mg olarak 2 mg/l 2,4-D’nin karanlık kültürlerinde tespit edilmiştir. NN ortamında 0.5 mg/l 2,4-D’nin karanlık uygulamasındaki eksplantlardan 110.5 mg kallus elde edilirken bunun dışındaki uygulamalardan elde edilen kallus miktarları 32.0 mg ile 64.5 mg arasında değişmiştir. MS ortamında en yüksek kallus miktarı 174.5 mg olarak 0.5 mg/l 2,4-D’nin karanlık kültürlerinden en düşük kallus miktarı 36.0 mg olarak 1 mg/l 2,4-D’nin aydınlık kültürlerinden elde edilmiştir.

Tüm uygulamalarda sıfır dereceli kallus oluşumu (canlılığını kaybeden eksplantlar) yalnızca 5 ortamda meydana gelmiştir (MS + 2 mg/l 2,4-D + karanlık, NN + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık, B5 + 0.5 ve 2 mg/l 2,4-D + aydınlık, MS + 2 mg/l 2,4-D + aydınlık). Kallus oluşturmayan eksplantların oranı (1 dereceli) ise %8.4 (MS + 4 mg/l 2,4-D + aydınlık) ile %33.4 (NN + 4 mg/l 2,4-D + karanlık) değerleri arasında değişmiştir. İki dereceli kallus oluşumu yalnızca B5 ortamına eklenen 4 mg/l 2,4-D’nin aydınlık uygulamalarında %10 oranında tespit edilmiştir.

Eksplantların tamamı bütün uygulamalarda 3 dereceli kallus oluşturmuşlardır. 1 mg/l 2,4-D eklenmiş MS ve B5 ortamlarının karanlık uygulamalarında %100 oranında üç dereceli kallus oluşumu gözlenmiştir. Diğer uygulamalarda MS'te %62.5 ile %87.5, NN'de %22.5 ile %90, B5'te %10.0 ile %90.0 arasında değişen oranlarda 3 dereceli kallus oluşumu saptanmıştır. Dört dereceli kallus oluşumu genelde aydınlık uygulamalarında görülmüştür. Bu bakımdan en yüksek değer 0.5 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamında %80 olarak tespit edilmiştir. Beş dereceli kallus oluşumu yalnızca 2 ve 4 mg/l 2,4-D eklenen MS ortamının karanlıktaki kültürlerinde (sırasıyla %8.4 ve %12.5) ve 0.5 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamı aydınlık uygulamalarında (%10) meydana gelmiştir. Tüm uygulamalar incelendiğinde kallus oluşumunun genelde 3 dereceli olarak meydana geldiği gözlenmiştir.

Denemede kullanılan bütün ortam ve 2,4-D konsantrasyonları ile aydınlık karanlık uygulamaları incelendiğinde embriyojenik kallus oranının %60'ın üzerinde (B5 + 2 mg/l 2,4-D + aydınlık) olduğu dikkati çekmektedir.

4.1.1.1.(2).(b). Embriyo Uyartımı

Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vitro* yaprak ayası eksplantı farklı uygulamalarda değişik oranlarda embriyojenik kallus oluşturmuş ve bu kalluslar aynı ortamların hormon içermeyenine yerleştirildiğinde somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.13. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	100	113.0 ± 2.4	0	0	0	87.5 ± 12.4	12.5 ± 12.5	0	100
		Karanlık	100	174.5 ± 12.3	0	0	0	80.0 ± 22.6	20.0 ± 20.0	0	100
	1.0	Aydınlık	75.0 ± 26.5	36.0 ± 12.7	0	25.0 ± 25.0	0	75.0 ± 26.5	0	0	100
		Karanlık	87.5 ± 12.4	45.5 ± 12.9	0	0	0	100	0	0	100
	2.0	Aydınlık	62.5 ± 13.3	159.0 ± 89.9	12.5 ± 12.5	25.0 ± 25.0	0	62.5 ± 13.3	0	0	100
		Karanlık	100	153.5 ± 32.6	10.0 ± 10.0	0	0	81.7 ± 0	0	8.4 ± 8.4	80.0 ± 0
	4.0	Aydınlık	91.7 ± 6.5	108.0 ± 0.8	0	8.4 ± 8.4	0	71.7 ± 10.1	20.0 ± 20.0	0	100
		Karanlık	100	131.0 ± 37.1	0	0	0	87.5 ± 12.4	0	12.5 ± 12.5	75.0 ± 26.5

Çizelge 4.14. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	77.5 ± 2.2	39.5 ± 14.0	10.0 ± 10.0	12.5 ± 12.5	0	22.5 ± 3.2	45.0 ± 6.4	0	70.9 ± 5.0
		Karanlık	80.0 ± 22.6	110.5 ± 39.1	0	20.0 ± 20.0	0	70.0 ± 29.7	0	10.0 ± 10.0	83.4 ± 17.7
	1.0	Aydınlık	100	57.0 ± 0.8	0	0	0	80.0 ± 0	20.0 ± 0	0	100
		Karanlık	70.0 ± 9.9	32.0 ± 9.1	0	30.0 ± 10.6	0	70.0 ± 9.9	0	0	66.7 ± 33.0
	2.0	Aydınlık	100	45.5 ± 6.4	0	0	0	90.0 ± 12.7	10.0 ± 10.0	0	100
		Karanlık	80.0 ± 0	64.5 ± 41.0	0	20.0 ± 0	0	80.0 ± 0	0	0	87.5 ± 12.4
	4.0	Aydınlık	100	58.2 ± 1.6	0	0	0	90.0 ± 12.7	10.0 ± 10.0	0	100
		Karanlık	66.7 ± 18.9	54.5 ± 19.3	0	33.4 ± 16.5	0	66.7 ± 18.9	0	0	80.0 ± 22.6

Çizelge 4.15. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak ayası eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Karanlık	66.7 ± 18.9	54.5 ± 19.3	0	33.4 ± 16.5	0	66.7 ± 18.9	0	0	80.0 ± 22.6
		Aydınlık	90.0 ± 12.7	84.5 ± 6.0	10.0 ± 10.0	0	0	10.0 ± 9.9	80.0 ± 0	0	100
		Karanlık	90.0 ± 12.7	134.5 ± 28.5	0	10.0 ± 10.0	0	90.0 ± 12.7	0	0	75.0 ± 26.5
	1.0	Aydınlık	90.0 ± 12.7	87.5 ± 6.2	10.0 ± 10.0	0	0	60.0 ± 21.2	30.0 ± 30.0	0	100
		Karanlık	100	181.5 ± 64.2	0	0	0	100	0	0	100
		Aydınlık	100	113.0 ± 24.0	0	0	0	80.0 ± 0	20.0 ± 0	0	60.0 ± 0
	2.0	Karanlık	100	198.5 ± 70.2	0	0	0	87.5 ± 12.4	12.5 ± 12.5	0	100
		Aydınlık	80.0 ± 22.6	78.0 ± 16.5	0	20.0 ± 20.0	10.0 ± 10.0	70.0 ± 26.7	0	0	90.0 ± 12.7
		Karanlık	80.0 ± 22.6	164.0 ± 46.4	0	30.0 ± 10.6	0	50.0 ± 28.3	20.0 ± 20.0	0	100

4.1.3. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular

4.1.3.1. *In Vivo* Bulguları

4.1.3.1.(1). 41 B

4.1.3.1.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı

41 B anacının *in vivo* koşullardan alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen bulgular Çizelge 4.16, 4.17 ve 4.18’de sunulmuştur.

MS ortamına eklenen tüm 2,4-D konsantrasyonlarında karanlıktaki kültürler aydınlıktakilere göre daha yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. NN ve B5 ortamlarında ise aydınlık ile karanlık etkileri 2,4-D konsantrasyonlarına göre değişiklik göstermiştir. Kallus oluşum oranları MS’de %26.7, NN’de %70 ve B5 ortamında ise %83.3’ün üzerinde gerçekleşmiştir. Kallus ağırlığı incelendiğinde B5 ortamındaki kültürlerin çok belirgin olarak MS ve NN ortamlarına göre daha yüksek miktarda kallus oluşturduğu görülmektedir. B5 ortamının aydınlık uygulamalarında karanlıktan daha yüksek miktarda kallus oluşmuştur. B5 ortamında en yüksek kallus oluşumu 1 ve 2 mg/l 2,4-D’nin aydınlık kültürlerinden (sırasıyla 1434.3 mg ve 1319.1mg) elde edilmiştir.

41 B anacının *in vivo* yaprak eksplantında farklı derecelerde kallus oluşturma oranlarına bakıldığında, B5 ve NN ortamlarında 0 dereceli kallus oluşumu %20.0’yi (NN + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık) geçmemiş, oysa MS ortamında aydınlık kültürlerde 0 dereceli kallus oluşumu %3.3 (MS + 4 mg/l 2,4-D + karanlık) ile %73.3 (MS + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık) arasında değişen oranlarda ortaya çıkmıştır. Bir dereceli kallus oluşumu ortamlara, 2,4-D konsantrasyonuna ve kültür koşullarına göre değişmiştir. Bu değerler %0 ile %20 arasında yer almıştır. Denemede kullanılan tüm uygulamalarda eksplantlar değişen oranlarda 2 ve 3 (MS + 2 mg/l 2,4-D + karanlık uygulaması dışında) dereceli kallus oluşturmuşlardır. Dört dereceli kalluslar MS ortamına eklenen 2 ve 4 mg/l 2,4-D’nin karanlık kültürlerinde (sırasıyla %12.5 ve %3.3), NN + 1mg/l 2,4-D’nin karanlık uygulamalarında (%3.3), B5 ortamında ise 1 ve 2 mg/l 2,4-D’nin karanlık (sırasıyla %6.7 ve %3.3) ve 4 mg/l 2,4-D’nin aydınlık koşullarında (%3.3) oluşmuştur. Denemede kullanılan tüm ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık kültürlerinde 5 dereceli kallus oluşumu

meydana gelmiştir. En yüksek 5 dereceli kallus oluşumu %70.0 oranında ve B5 ortamına eklenen 0.5 ve 2 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde, en düşük değer ise %6.7 ile MS + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık uygulamalarında elde edilmiştir. Genelde tüm uygulamalarda 2, 3 ve 5 dereceli kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Embriyojenik kallus oluşturma oranı bakımından en yüksek değerlerin B5'de özellikle 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D bulunan ortamların karanlıkta tutulan kültürlerinden (sırasıyla %84.7, %92.7 ve %90.0) elde edildiği belirlenmiştir.

4.1.3.1.(1).(b). Embriyo Uyartımı

Farklı uygulamalardan elde edilen embriyojenik kalluslar oluştukları besin ortamının hormon içermeyenine aktarıldığında somatik embriyo oluşturmamışlardır.

Çizelge 4.16. 41 B anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	26.7 ± 10.7	56.1 ± 37.6	73.3 ± 9.8	0	16.7 ± 5.2	3.3 ± 3.3	0	6.7 ± 6.7	45.0 ± 22.1
		Karanlık	53.3 ± 11.9	37.8 ± 27.0	26.7 ± 10.7	20.0 ± 8.0	13.3 ± 9.5	10.0 ± 4.0	0	30.0 ± 12.7	44.0 ± 17.7
	1.0	Aydınlık	66.6 ± 14.9	162.5 ± 58.1	33.4 ± 13.4	0	26.7 ± 8.4	26.7 ± 10.7	0	13.3 ± 5.9	67.3 ± 9.0
		Karanlık	80.0 ± 10.7	95.4 ± 34.1	6.7 ± 4.2	13.3 ± 5.9	50.0 ± 8.9	6.7 ± 6.7	0	20.0 ± 9.8	58.7 ± 7.9
	2.0	Aydınlık	60.0 ± 13.4	254.2 ± 79.6	40.0 ± 14.3	0	20.0 ± 9.8	13.4 ± 3.6	0	26.7 ± 8.4	26.7 ± 10.7
		Karanlık	83.3 ± 12.5	83.7 ± 18.7	4.2 ± 4.2	12.5 ± 12.5	33.3 ± 11.8	0	12.5 ± 7.9	37.5 ± 4.1	73.3 ± 11.4
	4.0	Aydınlık	76.0 ± 6.8	368.9 ± 148.5	20.7 ± 6.5	3.3 ± 3.3	20.0 ± 16.1	14.0 ± 10.0	0	42.0 ± 15.0	37.3 ± 11.7
		Karanlık	93.3 ± 4.2	116.5 ± 26.1	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	36.7 ± 11.5	10.0 ± 6.7	3.3 ± 3.3	43.3 ± 7.7	68.0 ± 9.1

Çizelge 4.17. 41 B anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	93.3 ± 4.1	818.3 ± 109.8	20.0 ± 12.5	0	30.0 ± 10.7	33.3 ± 10.4	0	16.7 ± 7.5	32.7 ± 7.3
		Karanlık	70.0 ± 9.4	192.8 ± 34.5	10.0 ± 6.7	20.0 ± 8.0	13.4 ± 3.6	13.3 ± 5.9	0	43.3 ± 7.7	36.0 ± 11.3
	1.0	Aydınlık	93.3 ± 8.3	632.1 ± 141.3	6.7 ± 6.6	0	16.7 ± 5.2	30.0 ± 13.4	0	46.7 ± 6.3	38.3 ± 12.0
		Karanlık	80.0 ± 3.6	82.3 ± 7.4	6.7 ± 4.2	13.4 ± 3.6	20.0 ± 8.0	20.0 ± 6.3	3.3 ± 3.3	36.7 ± 14.8	66.0 ± 14.8
	2.0	Aydınlık	96.7 ± 4.3	693.4 ± 93.0	3.3 ± 3.3	0	16.7 ± 0	43.3 ± 9.7	0	36.7 ± 8.2	35.3 ± 9.5
		Karanlık	83.3 ± 7.5	79.0 ± 24.7	3.3 ± 3.3	13.3 ± 5.9	13.4 ± 3.6	33.4 ± 6.0	0	36.7 ± 11.5	65.3 ± 5.8
	4.0	Aydınlık	93.3 ± 4.2	718.1 ± 128.5	6.7 ± 4.2	0	10.0 ± 6.7	33.3 ± 6.0	0	50.0 ± 11.2	29.3 ± 9.2
		Karanlık	96.7 ± 4.3	68.0 ± 21.3	0	3.3 ± 3.3	16.7 ± 5.2	16.7 ± 5.2	0	63.3 ± 5.7	60.0 ± 18.8

Çizelge 4.18. 41 B anacından *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	93.3 ± 4.2	860.9 ± 269.5	0	6.7 ± 4.2	30.7 ± 5.5	27.3 ± 8.5	0	35.3 ± 11.1	0
		Karanlık	96.7 ± 4.3	262.5 ± 47.0	3.3 ± 3.3	0	16.7 ± 5.2	10.0 ± 4.0	0	70.0 ± 9.4	66.0 ± 17.7
	1.0	Aydınlık	100	1434.3 ± 128.3	0	0	30.0 ± 9.4	13.3 ± 5.9	0	56.7 ± 5.1	3.3 ± 3.3
		Karanlık	83.3 ± 3.7	143.7 ± 43.1	13.3 ± 5.9	3.3 ± 3.3	16.7 ± 7.5	6.7 ± 4.2	6.7 ± 4.2	53.3 ± 9.5	84.7 ± 7.6
	2.0	Aydınlık	96.7 ± 4.3	1319.1 ± 177.0	0	3.3 ± 3.3	10.0 ± 6.7	23.3 ± 8.3	0	63.3 ± 8.5	6.7 ± 6.7
		Karanlık	96.7 ± 4.3	166.1 ± 52.0	3.3 ± 3.3	0	20.0 ± 3.6	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	70.0 ± 3.1	92.7 ± 4.1
	4.0	Aydınlık	100	925.3 ± 289.7	0	0	6.7 ± 4.2	23.3 ± 8.3	3.3 ± 3.3	66.7 ± 6.0	6.7 ± 6.7
		Karanlık	86.7 ± 11.6	184.6 ± 24.8	6.7 ± 6.7	6.7 ± 4.2	6.7 ± 4.2	13.4 ± 3.6	0	66.7 ± 11.9	90.0 ± 8.0

4.1.3.1.(2). Yalova İncisi

4.1.3.1.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı

Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerinden alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen ve Çizelge 4.19, 4.20 ve 4.21’de verilen bulgular incelendiğinde denemede kullanılan bütün ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık kültürlerinde karanlığa göre daha yüksek oranda kallus oluşumu sağlanmıştır. MS ortamında en yüksek kallus oranı %76.7 (2 mg/l 2,4-D + aydınlık), NN ortamında %79.2 (4 mg/l 2,4-D + aydınlık), B5 de ise %100 (1 mg/l 2,4-D + aydınlık) olmuştur. Eksplantlarda oluşan kallusların ağırlıkları, MS ortamının değişik 2,4-D konsantrasyonları incelendiğinde aydınlık uygulamalarında 1 ve 2 mg/l 2,4-D konsantrasyonlarında en yüksek bulunmuştur. NN’de 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D’nin karanlık uygulamaları aydınlığa göre nispeten daha iyi olur iken 2 ve 4 2,4-D mg/l konsantrasyonlarının aydınlık uygulamaları karanlıktan daha iyi değerler vermiştir. B5 ortamında da aydınlık uygulamalar karanlıktan daha üstün bulunmuştur. Bu kültürlerdeki B5 konsantrasyonları içinde en yüksek değeri 1 mg/l 2,4-D (352.4 mg) içeren ortam vermiştir. B5 ortamında oluşan kallusların diğer ortamlardakilerden daha ağır olduğu belirgin olarak görülmüştür.

Sıfır dereceli kallus oluşumu ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık karanlık uygulamalarına göre değişmiştir. Bu bakımdan MS ortamında NN ve B5’e göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bir dereceli kallus oluşumu 0.5 mg/l 2,4-D ilaveli MS ve 1 mg/l 2,4-D ilaveli B5’in aydınlık koşulları dışında tüm uygulamalarda değişik oranlarda belirlenmiştir. İki dereceli kallus oluşumu bakımından yapılan incelemede MS ortamının aydınlık kültürlerinde oranların karanlıktan daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. B5 ortamında ise MS ortamının tamamen tersi bir durum gözlenmiştir. 2 mg/l 2,4-D içeren NN ortamında 2 dereceli kallus meydana gelmemiş, 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamların aydınlıkta tutulanlarında karanlıktan, 4 mg/l 2,4-D bulunduranlarda ise karanlıktakiler aydınlıktan daha yüksek oranlar vermiştir. Üç dereceli kallus oluşumu denenen tüm ortamlar ve koşullarda ya hiç oluşmamış yada çok düşük değerlerde (%4.2) olmuştur. 4

dereceli kallus oluşumu uygulamalara göre değişmek üzere % 0 ile %37.5; 5 dereceli kallus oluşumu ise %0 ile %76.7 arasında değişen oranlarda gerçekleşmiştir.

Embriyojenik kallus oranı, 1 mg/l 2,4-D bulunduran MS ortamının aydınlıkta tutulan kültürlerinde %96, diğer 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık kültürlerinde ise %100 olarak tespit edilmiştir. NN'e eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlık ve karanlık koşullarında ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık koşullarında %85.0 olur iken diğer konsantrasyonların aydınlık ve karanlık koşullarından elde edilen kallusların tamamı embriyojenik kapasiteli bulunmuştur. B5 ortamında ise bu özellik için saptanan değerler %54.2 ile %100 arasında değişmiştir (**Çizelge 4.19, 4.20 ve 4.21**).

4.1.3.1.(2).(b). Embriyo Uyartımı

Yalova İncisi'nin *in vivo* yaprak sapı eksplantlarından farklı besi ortamı, 2,4-D konsantrasyonu ve büyütme koşullarında elde edilen embriyojenik kalluslar oluştukları besi ortamının hormonsuzuna aktarıldığında somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.19. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	58.3 ± 14.6	80.0 ± 32.2	41.7 ± 16.7	0	8.4 ± 4.6	4.2 ± 4.2	16.7 ± 6.7	29.2 ± 7.3	100
		Karanlık	29.2 ± 13.1	7.2 ± 3.9	25.0 ± 11.3	45.8 ± 6.9	8.3 ± 8.3	0	8.4 ± 4.6	12.5 ± 4.4	100
	1.0	Aydınlık	70.0 ± 12.5	152.8 ± 41.0	30.0 ± 13.4	3.3 ± 3.3	10.0 ± 4.0	0	10.0 ± 4.0	46.7 ± 12.5	96.0 ± 4.3
		Karanlık	25.0 ± 8.8	31.6 ± 18.4	37.5 ± 11.3	37.5 ± 13.1	4.2 ± 4.2	0	0	20.9 ± 10.5	100
	2.0	Aydınlık	76.7 ± 3.4	129.6 ± 17.4	13.3 ± 5.9	10.0 ± 6.3	33.3 ± 6.0	0	3.3 ± 3.3	40.0 ± 3.6	100
		Karanlık	33.3 ± 11.7	31.4 ± 15.4	16.7 ± 11.7	50.0 ± 12.5	8.4 ± 4.6	0	8.4 ± 4.6	16.7 ± 6.7	100
	4.0	Aydınlık	62.5 ± 15.6	55.0 ± 12.3	25.0 ± 15.0	12.5 ± 12.5	16.7 ± 6.7	0	20.9 ± 10.5	25.0 ± 11.3	100
		Karanlık	25.0 ± 11.3	15.2 ± 8.2	0	75.0 ± 11.3	4.2 ± 4.2	4.2 ± 4.2	0	16.7 ± 10.0	100

Çizelge 4.20. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	36.7 ± 16.4	17.6 ± 15.0	6.7 ± 6.6	56.7 ± 17.7	16.7 ± 7.5	0	16.7 ± 7.5	3.3 ± 3.3	93.3 ± 4.2
		Karanlık	20.8 ± 8.3	19.4 ± 9.5	16.7 ± 6.7	50.0 ± 12.5	12.5 ± 8.1	0	8.4 ± 4.6	0	83.3 ± 12.5
	1.0	Aydınlık	37.5 ± 11.3	15.4 ± 6.9	33.3 ± 20.0	29.2 ± 14.6	8.4 ± 4.6	0	20.9 ± 4.2	8.3 ± 8.3	100
		Karanlık	8.4 ± 4.6	19.0 ± 5.1	12.5 ± 8.1	79.2 ± 11.9	4.2 ± 4.2	0	0	4.2 ± 4.2	100
	2.0	Aydınlık	54.2 ± 16.3	81.2 ± 25.4	25.0 ± 11.3	20.9 ± 8.4	0	4.2 ± 4.2	25.0 ± 8.8	25.0 ± 20.0	100
		Karanlık	16.7 ± 11.7	24.6 ± 13.2	20.8 ± 8.3	50.0 ± 15	0	0	8.3 ± 8.3	8.4 ± 4.6	100
	4.0	Aydınlık	79.2 ± 4.0	220.4 ± 39.4	16.7 ± 6.7	4.2 ± 4.2	12.5 ± 8.1	0	12.5 ± 12.5	54.2 ± 13.6	85.0 ± 8.5
		Karanlık	41.7 ± 10.4	44.8 ± 4.0	16.7 ± 11.7	41.7 ± 20.9	25.0 ± 15.0	4.2 ± 4.2	4.2 ± 4.2	8.3 ± 8.3	100

Çizelge 4.21. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vivo* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	75.0 ± 18.8	244.0 ± 55.7	16.7 ± 16.7	8.4 ± 4.6	16.7 ± 11.7	0	8.3 ± 8.3	50.0 ± 12.5	54.2 ± 16.3
		Karanlık	50.0 ± 17.5	15.0 ± 6.0	0	50.0 ± 17.5	29.2 ± 10.2	4.2 ± 4.2	0	16.7 ± 11.7	66.7 ± 23.3
	1.0	Aydınlık	100 ± 0	352.4 ± 47.3	0	0	3.3 ± 3.3	0	20.0 ± 9.8	76.7 ± 6.9	76.7 ± 13.7
		Karanlık	44.4 ± 5.1	33.0 ± 5.9	0	55.6 ± 6.4	22.2 ± 5.1	0	0	22.2 ± 11.5	100
	2.0	Aydınlık	83.3 ± 8.3	153.2 ± 27.4	4.2 ± 4.2	12.5 ± 8.1	4.2 ± 4.2	0	37.5 ± 15.0	41.7 ± 16.7	89.6 ± 4.5
		Karanlık	66.7 ± 13.3	29.8 ± 8.0	8.4 ± 4.6	25.0 ± 11.3	37.5 ± 15.0	0	8.4 ± 4.6	20.9 ± 10.5	100
	4.0	Aydınlık	83.4 ± 8.3	237.4 ± 74.3	12.5 ± 8.1	4.2 ± 4.2	8.3 ± 8.3	0	25.0 ± 16.3	50.0 ± 17.5	100
		Karanlık	37.5 ± 3.8	13.0 ± 5.8	4.2 ± 4.2	58.4 ± 5.8	37.5 ± 3.8	0	0	0	100

4.1.3.2. In Vitro Bulguları**4.1.3.2.(1). 41 B****4.1.3.2.(1).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı**

41 B anacının *in vitro* da yetiştirilen bitkiciklerinden alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen bulgular Çizelge 4.22, 4.23 ve 4.24’de gösterilmiştir.

Çizelgeden de görülebileceği gibi denemede kullanılan tüm uygulamalarda eksplantların tamamı kallus oluşturmuştur. Bu eksplantlarda oluşan kallusların ağırlıklarına bakıldığında ise MS’de 122.7 mg ve NN’de 125.7 mg’ın altında, B5’de ise 143.9 mg’in üzerinde kallus ağırlık değerleri elde edilmiştir. Tüm uygulamalar dikkate alındığında kallus ağırlıklarının 56.0 mg ile 269.6 mg arasında değiştiği görülmektedir. Aydınlik ve karanlık uygulamaları arasında da genellikle büyük farklılıklar gözlenmemiştir.

41 B anacı yaprak sapı eksplantlarının tamamı kallus oluşturmuştur. 2 ve 3 dereceli kallus oluşumu, ortamlara, konsantrasyonlara ve kültür koşullarına göre değişmiştir. İki dereceli kallus oluşumu %0 ile %16.7 aralığında meydana gelmiştir. 0.5 mg/l 2,4-D + NN + aydınlık uygulamasındaki eksplantların tamamı (%100) üç dereceli kallus oluşturmuştur. Dört dereceli kallus oluşumu 4 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamının karanlık kültürleri (%5.6) dışında hiçbir uygulamada görülmemiştir. Hemen hemen tüm uygulamalarda (NN + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık dışında) 5 dereceli kallus oluşumu tespit edilmiştir. Aydınlik ve karanlık birlikte değerlendirildiğinde MS’de %61.1 ile %94.4, NN’de %0 ile %94.4, B5’de %73.3 ile %100 arasında değişen oranlarda 5 dereceli kallus oluşumu meydana gelmiştir. Farklı derecelerde kallus oluşumu tüm uygulamalarda genelde 2, 3 ve 5 dereceli olarak meydana gelmiştir.

Embriyojenik kallus oluşumu MS + 1 ve 2 mg/l 2,4-D’nin aydınlıktaki kültürlerinde %89.9 oranında meydana gelirken diğer 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamalarında %100 oranında gerçekleşmiştir. Genel olarak embriyojenik kallus oranı NN ortamında %61.1’in, B5’de ise %53.3’ün üzerinde meydana gelmiştir. NN ve B5’in 1 ve 2 mg/l 2,4-D bulunduran ortamlarının karanlık

kültürlerinden %100 oranında embriyojenik kapasiteye sahip kalluslar elde edilmiştir.

4.1.3.2.(1).(b). Embriyo Uyartımı

Farklı uygulamalardan elde edilen embriyojenik kalluslar oluştukları besi ortamının hormon içermeyenine aktarıldığında somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.



Çizelge 4.22. 41 B anacından *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	100	74.5 ± 0.9	0	0	0	22.2 ± 11.5	0	77.8 ± 9.0	100
		Karanlık	100	67.7 ± 3.9	0	0	0	22.2 ± 5.1	0	77.8 ± 4.5	100
	1.0	Aydınlık	100	97.9 ± 39.6	0	0	11.1 ± 5.8	16.7 ± 16.7	0	72.2 ± 20.8	88.9 ± 5.1
		Karanlık	100	122.7 ± 14.2	0	0	5.6 ± 5.6	0	0	94.4 ± 5.5	100
	2.0	Aydınlık	100	80.3 ± 4.6	0	0	11.1 ± 11.1	16.7 ± 0	0	72.2 ± 12.5	88.9 ± 10.3
		Karanlık	100	74.7 ± 4.3	0	0	6.7 ± 6.7	0	0	93.3 ± 5.4	100
	4.0	Aydınlık	100	94.0 ± 10.9	0	0	0	38.9 ± 15.7	0	61.1 ± 14.1	100
		Karanlık	100	92.5 ± 10.7	0	0	11.1 ± 11.1	0	0	88.9 ± 10.3	100

Çizelge 4.23. 41 B anaçından *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	100	97.2 ± 28.1	0	0	0	100 ± 0	0	0	77.8 ± 9.0
		Karanlık	100	56.0 ± 6.5	0	0	13.3 ± 6.9	26.7 ± 13.9	0	60.0 ± 10.4	86.7 ± 15.0
	1.0	Aydınlık	100	63.2 ± 10.9	0	0	16.7 ± 16.7	66.7 ± 15.4	0	16.7 ± 16.7	61.1 ± 24.7
		Karanlık	100	61.5 ± 7.1	0	0	11.1 ± 11.1	22.2 ± 21.8	0	66.7 ± 34.7	100
	2.0	Aydınlık	100	97.5 ± 11.3	0	0	8.3 ± 8.3	27.2 ± 6.3	0	64.4 ± 11.2	75.6 ± 13.1
		Karanlık	100	102.1 ± 11.8	0	0	0	5.6 ± 5.6	0	94.4 ± 5.5	100
	4.0	Aydınlık	100	85.3 ± 9.8	0	0	6.7 ± 6.7	26.7 ± 17.0	0	66.7 ± 11.6	86.7 ± 5.0
		Karanlık	100	125.7 ± 21.8	0	0	5.6 ± 5.6	16.7 ± 9.6	5.6 ± 5.6	72.2 ± 16.7	88.9 ± 10.3

Çizelge 4.24. 41 B anacından *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	100	209.3 ± 24.2	0	0	13.3 ± 6.9	13.3 ± 13.31	0	73.3 ± 16.9	53.3 ± 12.3
		Karanlık	100	207.7 ± 24.0	0	0	0	0	0	100 ± 0	80.0 ± 18.5
	1.0	Aydınlık	100	186.4 ± 21.5	0	0	6.7 ± 6.7	20.0 ± 11.5	0	73.3 ± 12.7	53.3 ± 18.5
		Karanlık	100	143.9 ± 16.6	0	0	0	0	0	100 ± 0	100
	2.0	Aydınlık	100	269.6 ± 124.5	0	0	0	25.0 ± 14.4	0	75.0 ± 13.0	83.3 ± 9.6
		Karanlık	100	218.3 ± 50.4	0	0	0	0	0	100 ± 0	100
	4.0	Aydınlık	100	201.7 ± 46.6	0	0	0	13.3 ± 6.9	0	86.7 ± 5.0	80.0 ± 13.9
		Karanlık	100	194.7 ± 22.5	0	0	0	0	0	100 ± 0	86.7 ± 15.0

4.1.3.2.(2). Yalova İncisi**4.1.3.2.(2).(a). Embriyojenik Kallus Uyartımı**

Yalova İncisi'nin *in vitro* bitkiciklerinden alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen bulgular Çizelge 4.25, 4.26 ve 4.27'de sunulmuştur.

MS'e eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'li ortam da ve aydınlık koşullarda tutulan eksplantların tamamı (%100) kallus oluştururken, diğer konsantrasyon ve koşullarda ise kallus oluşturan eksplantların oranı %36.7 ile %95.0 arasında değişmiştir. NN'e eklenen 0.5, 1 ve 2 mg/l 24-D'nin aydınlık ve karanlık kültürlerindeki eksplantların %100'ü kallus oluşturmıştır. B5 ortamında ise 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık uyulaması dışında diğer tüm konsantrasyon ve koşullardan %100 oranında kallus elde edilmiştir. Denemede kullanılan tüm uygulamalar birlikte incelendiğinde elde edilen kallus ağırlıklarının genelde düşük olduğu görülmektedir. B5 ortamından diğerlerine göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bütün uygulamalar içerisinde en yüksek kallus ağırlığı 0.5 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamının aydınlık kültürlerinde 83.4 mg olarak tespit edilmiştir.

Farklı derecelerde kallus oluşturma oranları incelendiğinde farklı ortam, 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında, 0 – 5 arasında değişen derecelerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Sıfır dereceli kallus oluşumu (canlılığını kaybeden eksplantlar) daha çok MS ortamının farklı 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık kültür koşullarında %26.7'nin altındaki oranlarda meydana gelmiştir. Bir dereceli kallus oluşumu 4 mg/l 2,4-D bulunduran MS ortamının aydınlık (%36.7) ve karanlık (%20) kültürlerinde, 4 mg/l 2,4-D bulunduran NN ve B5'in karanlık koşullarında (sırasıyla %12.5 ve %10) saptanmıştır. Denemede kullanılan tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde 2 dereceli kallus oluşumu %0 ile %70, 3 dereceli %0 ile %30, 4 dereceli %0 ile %50 ve 5 dereceli kallus oluşumu ise %0 ile %100 arasında değişen oranlarda meydana gelmiştir. Tüm uygulamalar dikkate alındığında eksplantlardan en yoğun olarak 2, 4 ve 5 dereceli kallusların elde edildiği saptanmıştır.

Embriyojenik kallus oluşumu MS ortamının 4 mg/l 2,4-D içeren karanlık kültürlerinde %87.5, 1 mg/l 2,4-D ekli NN ortamının karanlığında %90.0, MS ve NN'in diğer tüm konsantrasyon ve koşullarında ise %100 oranında saptanmıştır. B5

+ 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlık ve karanlık uygulamalarından %90 oranında, B5 + 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık ve karanlığından %100 oranında, 1 ve 2 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamının aydınlıktaki kültürlerinden %100, karanlığından da sırasıyla %75 ve %87.5 oranında embriyojenik kapasiteye sahip kalluslar elde edilmiştir.

4.1.3.2.(2).(b). Embriyo Uyartımı

Yalova İncisi'nin *in vitro* yaprak sapı eksplantları farklı besi ortamı, 2,4-D konsantrasyonu ve büyüme koşullarında oluşturdukları embriyojenik kalluslar oluştukları besi ortamlarının hormon içermeyenlerine aktarıldığında herhangi bir somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.25. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	100	34.7 ± 9.8	0	0	10.0 ± 10.0	16.7 ± 16.7	28.4 ± 12.0	45.0 ± 6.4	100
		Karanlık	87.5 ± 12.4	36.9 ± 5.2	12.5 ± 12.5	0	50.0 ± 0	25.0 ± 0	12.5 ± 12.5	0	100
	1.0	Aydınlık	90.0 ± 12.7	15.2 ± 0.4	12.5 ± 12.5	0	37.5 ± 37.5	0	50.0 ± 50.0	0	100
		Karanlık	95.0 ± 6.7	16.0 ± 0	10.0 ± 10.0	0	40.0 ± 40.0	0	50.0 ± 50.0	0	100
	2.0	Aydınlık	75.0 ± 26.5	41.6 ± 2.9	25.0 ± 25.0	0	8.4 ± 8.4	8.4 ± 8.4	0	58.4 ± 41.3	100
		Karanlık	90.0 ± 12.7	20.8 ± 8.8	10.0 ± 10.0	0	40.0 ± 19.8	20.0 ± 20.0	20.0 ± 0	10.0 ± 10.0	100
	4.0	Aydınlık	36.7 ± 2.6	15.5 ± 6.6	26.7 ± 7.6	36.7 ± 2.6	18.4 ± 1.3	10.0 ± 10.0	8.4 ± 8.4	0	100
		Karanlık	67.5 ± 9.5	12.2 ± 3.5	12.5 ± 12.5	20.0 ± 20.0	45.0 ± 6.4	0	22.5 ± 3.2	0	87.5 ± 12.4

Çizelge 4.26. Yalova İncisi üretim çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	100	22.1 ± 1.6	0	0	10.0 ± 10.0	0	20.0 ± 0	70.0 ± 9.9	100
		Karanlık	100	36.2 ± 7.7	0	0	10.0 ± 10.0	10.0 ± 10.0	40.0 ± 19.8	40.0 ± 40.0	100
	1.0	Aydınlık	100	23.7 ± 3.4	0	0	50.0 ± 10.6	0	20.0 ± 20.0	30.0 ± 10.6	100
		Karanlık	100	23.4 ± 6.6	0	0	20.0 ± 0	20.0 ± 20.0	20.0 ± 20.0	40.0 ± 0	90.0 ± 12.7
	2.0	Aydınlık	100	33.1 ± 4.7	0	0	8.4 ± 8.4	0	0	91.7 ± 6.5	100
		Karanlık	100	17.8 ± 0	0	0	10.0 ± 10.0	30.0 ± 10.6	30.0 ± 10.6	30.0 ± 10.6	100
	4.0	Aydınlık	75.0 ± 26.5	18.7 ± 13.2	25.0 ± 25.0	0	25.0 ± 25.0	25.0 ± 25.0	0	50.0 ± 50.0	100
		Karanlık	87.5 ± 12.4	21.7 ± 4.6	0	12.5 ± 12.5	62.5 ± 13.3	0	12.5 ± 12.5	12.5 ± 12.5	100

Çizelge 4.27. Yalova İncisi üzüm çeşidinden *in vitro* koşullarında alınan yaprak sapı eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	100	83.4 ± 0	0	0	20.0 ± 0	0	50.0 ± 10.6	30.0 ± 10.6	90.0 ± 12.7
		Karanlık	100	58.3 ± 4.1	0	0	0	0	20.0 ± 20.0	80.0 ± 22.6	90.0 ± 12.7
	1.0	Aydınlık	100	57.0 ± 4.0	0	0	8.4 ± 8.4	0	0	91.7 ± 6.5	100
		Karanlık	100	69.9 ± 24.7	0	0	12.5 ± 12.5	12.5 ± 12.5	12.5 ± 12.5	62.5 ± 35.4	75.0 ± 26.5
	2.0	Aydınlık	100	71.9 ± 25.4	0	0	0	0	0	100	100
		Karanlık	100	47.6 ± 6.7	0	0	37.5 ± 13.3	0	12.5 ± 12.5	50.0 ± 0	87.5 ± 12.4
	4.0	Aydınlık	100	37.5 ± 10.6	0	0	0	0	30.0 ± 30.0	70.0 ± 30.0	100
		Karanlık	90.0 ± 12.7	30.5 ± 15.1	0	10.0 ± 10.0	70.0 ± 10.0	10.0 ± 10.0	0	10.0 ± 10.0	100

4.1.4. Sülük Eksplantından Elde Edilen Bulgular**4.1.4.1. 41 B****4.1.4.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyarımı**

Çizelge 4.28 ve 4.29 ve 4.30'dan da görülebileceği gibi sülük eksplantları en yüksek orandaki kallusu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamının aydınlık kültürlerinde (%100) ve 4 mg/l 2,4-D bulunan B5 ortamının karanlık kültürlerinde (%100) oluşturmuştur. Kallus oluşturan eksplantların oranı MS ortamında %55.6, NN'de %66.7 ve B5 de ise %70.9'un üzerinde olmuştur. Elde edilen kallus ağırlıklarının, MS ortamındaki en yüksek değeri 392.4 mg (2 mg/l 2,4-D + aydınlık), NN ortamındaki en yüksek değeri 468.2 (2 mg/l 2,4-D + aydınlık) ve B5 ortamındaki en yüksek değeri ise 925.9 mg (4 mg/l 2,4-D + aydınlık) olarak bulunmuştur. En düşük kallus ağırlığı değeri MS'te 76.4 mg, NN'de 27.0 mg, B5'te ise 288.9 mg olarak saptanmıştır.

Denenen uygulamalara göre 0 ile 5 arasında değişen derecelerde kallus oluşumları gözlenmiştir. Canlılığını kaybeden eksplantlar (sıfır dereceli kallus) daha çok MS ortamında gözlenirken, NN ve B5 ortamlarından nispeten daha düşük değerler alınmıştır. Canlı olmalarına rağmen kallus oluşturmayan eksplantlar (bir dereceli) MS ortamında yalnızca 0.5 mg/l 2,4-D bulunan aydınlık kültürlerde %4.2 oranında, NN ve B5 ortamlarına eklenen farklı 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık uygulamalarında değişik oranlarda meydana gelmiştir. İki dereceli kallus oluşumu MS ortamında 2,4-D konsantrasyonlarına göre aydınlık ve karanlık kültürlerde düzenli bir farklılık göstermemiştir. MS ortamında 0.5 ve 2 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürleri karanlıktan, 1 ve 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürleri aydınlıktan daha yüksek değerler vermiştir. NN ve B5 ortamlarında aydınlık kültürler karanlıktan daha yüksek oranda iki dereceli kallus oluşturmuşlardır. Üç dereceli kallus oluşumunda MS, NN (1 mg/l 2,4-D dışında) ve B5 ortamlarındaki 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık uygulamaları karanlıktakilerden daha yüksek değerler vermiştir. Uygulamalara göre değişmek üzere 4 dereceli kallus oluşumu %0 ile %27.8 arasında değişen oranlarda görülmüştür. Beş dereceli kallus oluşumu tüm ortamların karanlık uygulamalarında aydınlıktan daha yüksek çıkmıştır. Karanlık

değerleri %6.7 ile %66.7 aralığında yer almıştır. Tüm uygulamalarda genel olarak 2, 3, 4 ve 5 dereceli kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.28, 4.29 ve 4.30).

Embriyojenik kallus bakımından yapılan incelemede bu özellikteki oluşumun yalnızca 2 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının karanlık kültürlerinde %100 oranında meydana geldiği saptanmıştır. Çizelge genel olarak incelendiğinde tüm ortamların karanlık uygulamaları çoğunlukla aydınlığa göre daha yüksek oranda embriyojenik kallus oluşturmuştur. Embriyojenik kallus oluşumu %34.6 (B5 + 2 mg/l 2,4-D + aydınlık)'nın üzerinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.28, 4.29 ve 4.30).

4.1.4.1.(2). Embriyo Uyartımı

Farklı uygulamalardan elde edilen embriyojenik kalluslar oluştukları besin ortamlarının hormonsuzuna aktarıldığında herhangi bir embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.28. 41 B anacının sütlük eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	62.5 ± 12.5	108.0 ± 29.0	33.3 ± 11.7	4.2 ± 4.2	37.5 ± 7.5	16.7 ± 11.7	0	8.4 ± 4.6	79.2 ± 11.9
		Karanlık	75.5 ± 8.7	76.4 ± 17.1	24.5 ± 7.1	0	28.9 ± 10.0	12.2 ± 6.3	5.6 ± 5.6	28.9 ± 10.0	56.7 ± 3.3
	1.0	Aydınlık	55.6 ± 6.4	148.1 ± 33.1	44.4 ± 5.1	0	22.2 ± 5.1	27.8 ± 4.8	5.6 ± 5.6	0	61.1 ± 21.2
		Karanlık	80.0 ± 13.9	169.2 ± 75.7	20.0 ± 11.5	0	46.7 ± 5.4	0	13.3 ± 13.3	20.0 ± 11.5	93.3 ± 5.4
	2.0	Aydınlık	100	392.4 ± 58.9	0	0	11.1 ± 5.8	30.6 ± 10.6	27.8 ± 11.2	30.5 ± 10.6	69.4 ± 20.0
		Karanlık	80.0 ± 0	215.8 ± 37.4	20.0 ± 0	0	6.7 ± 6.7	6.7 ± 6.7	6.7 ± 6.7	60.0 ± 0	100
	4.0	Aydınlık	72.2 ± 16.7	235.6 ± 58.9	27.8 ± 14.4	0	5.6 ± 5.6	22.2 ± 11.5	22.2 ± 5.1	22.2 ± 14.1	66.7 ± 19.3
		Karanlık	80.0 ± 18.5	233.1 ± 67.3	20.0 ± 20.0	0	20.0 ± 11.5	0	6.7 ± 6.7	53.3 ± 6.2	93.3 ± 5.4

Çizelge 4.29. 41 B anacının sütlük eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	73.3 ± 12.7	139.9 ± 62.6	6.7 ± 6.7	20.0 ± 11.5	60.0 ± 10.4	13.3 ± 6.9	0	0	86.7 ± 15.0
		Karanlık	93.3 ± 5.4	27.0 ± 4.7	6.7 ± 6.7	0	53.3 ± 12.3	6.7 ± 6.7	26.7 ± 17.0	6.7 ± 6.7	56.7 ± 22.9
	1.0	Aydınlık	80.0 ± 13.9	224.3 ± 70.2	6.7 ± 6.7	13.3 ± 6.9	60.0 ± 10.4	6.7 ± 6.7	6.7 ± 6.7	6.7 ± 6.7	52.2 ± 9.0
		Karanlık	66.7 ± 19.3	194.0 ± 137.2	26.7 ± 13.9	0	13.3 ± 6.9	13.3 ± 6.9	33.3 ± 13.5	13.3 ± 6.9	93.3 ± 5.4
	2.0	Aydınlık	87.5 ± 8.8	468.2 ± 125.6	8.4 ± 4.6	4.2 ± 4.2	37.5 ± 15.0	16.7 ± 11.7	12.5 ± 12.5	20.9 ± 10.5	39.2 ± 9.8
		Karanlık	66.7 ± 7.7	230.6 ± 82.5	33.3 ± 5.8	0	0	0	6.7 ± 6.7	60.0 ± 10.4	91.7 ± 10.6
	4.0	Aydınlık	78.3 ± 1.4	403.8 ± 201.9	6.7 ± 6.7	15.0 ± 7.8	38.3 ± 22.1	13.3 ± 13.3	13.3 ± 13.3	13.3 ± 13.3	66.7 ± 15.4
		Karanlık	80.0 ± 12.0	82.8 ± 82.0	20.0 ± 12.0	0	10.0 ± 6.0	5.0 ± 5.0	15.0 ± 9.8	50.0 ± 12.5	90.0 ± 9.0

Çizelge 4.30. 41 B anacının sütlük eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	91.7 ± 4.6	512.0 ± 137.4	0	8.4 ± 4.6	54.2 ± 13.6	25.0 ± 11.3	0	12.5 ± 8.1	18.3 ± 7.3
		Karanlık	79.2 ± 11.9	301.7 ± 54.0	20.9 ± 10.5	0	25.0 ± 8.8	8.4 ± 4.6	25.0 ± 11.3	20.8 ± 8.3	75.8 ± 11.4
	1.0	Aydınlık	70.9 ± 3.5	521.3 ± 116.6	8.3 ± 8.3	20.8 ± 8.3	25.0 ± 8.8	12.5 ± 8.1	20.9 ± 4.2	12.5 ± 8.1	36.3 ± 12.7
		Karanlık	94.4 ± 5.5	379.5 ± 132.8	5.6 ± 5.6	0	22.2 ± 14.1	5.6 ± 5.6	5.6 ± 5.6	61.1 ± 14.1	61.1 ± 7.1
	2.0	Aydınlık	83.3 ± 8.3	826.7 ± 110.9	4.2 ± 4.2	12.5 ± 4.4	58.4 ± 14.6	8.3 ± 8.3	4.2 ± 4.2	12.5 ± 4.4	34.6 ± 17.3
		Karanlık	87.5 ± 8.8	429.8 ± 86.0	12.5 ± 8.1	0	4.2 ± 4.2	4.2 ± 4.2	12.5 ± 8.1	66.7 ± 13.3	95.8 ± 4.8
	4.0	Aydınlık	88.9 ± 5.1	925.9 ± 165.6	0	11.1 ± 5.8	44.4 ± 10.3	27.8 ± 11.2	5.6 ± 5.6	11.1 ± 5.8	56.7 ± 3.3
		Karanlık	100	288.9 ± 43.3	0	0	5.6 ± 5.6	16.7 ± 9.6	11.1 ± 5.8	66.7 ± 15.4	88.9 ± 10.3

4.1.4.2. Yalova İncisi**4.1.4.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı**

Yalova İncisi sülük eksplantlarından elde edilen bulgulara göre, kullanılan ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamalarında kallus oluşturan eksplantların oranı genel olarak aydınlık kültürlerde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.31, 4.32 ve 4.33). Kallus oluşturan eksplant oranı bakımından MS'e eklenen 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık uygulamalarından en düşük değerler elde edilmiştir. 0.5 ve 4 mg/l 2,4-D + NN + karanlık uygulamaları dışındaki ortamların ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık kültürleri birbirine yakın değerler vermiştir. B5'e eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlığı dışında tüm uygulamalarda aydınlıkta tutulanlar karanlıktaki eksplantlardan daha fazla ağırlıkta kallus oluşturmışlardır. Aydınlıktaki kültürlerde ortalama kallus ağırlığı, MS, NN ve B5 ortamlarında 0.5 mg/l 2,4-D den 1 mg/l 2,4-D ye doğru artış, 1 mg/l 2,4-D den 4 mg/l 2,4-D ye doğru da bir azalış göstermiştir. En yüksek kallus ağırlıkları 1 mg/l 2,4-D bulunduran aydınlıktaki ortamlardan (B5'de 521.0 mg, MS'de 342.0 mg ve NN'de 221.8 mg) alınmıştır (Çizelge 4.31, 4.32 ve 4.33). NN ortamında canlılığını kaybeden eksplant (0 dereceli) görülmezken MS ve B5'e eklenen farklı 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık koşullarındaki eksplantlarda canlılık kaybı meydana gelmiştir. Bir dereceli kallus oluşumu (canlı fakat kallus yok) tüm uygulamalarda %0 ile %41.7 arasında değişen oranlarda meydana gelmiştir. Kullanılan ortamlar ve 2,4-D konsantrasyonlarında aydınlıktaki kültürler genelde karanlıktan daha yüksek oranda 2 dereceli kallus oluşumunu sağlamıştır. Üç dereceli kallus oluşumu MS ortamında karanlıkta; NN ve B5 ortamlarında ise aydınlıkta daha yüksek oranda belirlenmiştir. Dört dereceli kallus oluşumu 1 mg/l 2,4-D eklenen B5 ortamının aydınlık kültürlerinde görülmemiş bunun dışındaki tüm uygulamalarda oran %4.2 ile %62.5 arasında değişmiştir. Beş dereceli kallus oluşumu 0.5 mg/l 2,4-D bulunan NN'in aydınlık kültürlerinde saptanmamıştır. 1 mg/l 2,4-D bulunduran MS ortamının aydınlık kültürlerindeki eksplantlardan en yüksek oranda (%66.7) 5 dereceli kallus oluşumu elde edilmiştir. Farklı derecelerde kallus

oluşturma oranı genel olarak incelendiğinde tüm uygulamalarda daha çok 2, 3, 4 ve 5 dereceli kallus oluşumu meydana gelmiştir (Çizelge 4.31, 4.32 ve 4.33).

Embriyojenik kallus oranı, MS'e eklenen 0.5 mg/l 2,4-D nin aydınlığında %95.8 oranında, diğer 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamalarında %100 oranında tespit edilmiştir. NN ortamında ise değerler 2,4-D konsantrasyonları ve aydınlık karanlık uygulamalarına göre farklılık göstermiş, oranlar %80 ile %100 arasında değişmiştir. B5 ortamında ise karanlıktaki uygulamalar aydınlıktan daha yüksek oranda embriyojenik kapasitede kallus oluşturmuşlardır. Karanlıktaki değerler 2,4-D konsantrasyonlarının artışına paralel olarak artmıştır (sırasıyla %54.2, %87.5, %100 ve %100). B5 + 0.5, 1 ve 2 2,4-D ortamlarından aydınlık koşullarda elde edilen değerlerin denemede kullanılan diğer bütün uygulamalardan daha düşük olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.31, 4.32 ve 4.33).

4.1.4.2.(2). Embriyo Uyartımı

Farklı besi ortamı, 2,4-D konsantrasyonu ve büyüme koşullarında Yalova İncisi sülük eksplantlarından elde edilen embriyojenik kalluslar, oluştukları besin ortamlarının hormon içermeyenlerine aktarılmış ve bu kalluslardan somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.31. Yalova İncisi üzüm çeşidinin sütlük eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
MS	0.5	Aydınlık	83.4 ± 8.3	170.2 ± 30.4	12.5 ± 8.1	4.2 ± 4.2	20.8 ± 8.3	8.4 ± 4.6	29.2 ± 10.2	25.0 ± 8.8	95.8 ± 4.8
		Karanlık	100	119.6 ± 32.1	0	0	4.2 ± 4.2	12.5 ± 0.6	62.5 ± 12.5	20.8 ± 8.3	100
	1.0	Aydınlık	100	342.0 ± 30.6	0	0	22.2 ± 11.5	5.6 ± 5.6	5.6 ± 5.6	66.7 ± 15.4	100
		Karanlık	83.3 ± 0	174.0 ± 22.6	5.6 ± 5.6	11.1 ± 5.8	0	11.1 ± 5.8	38.9 ± 22.5	33.3 ± 17.3	100
	2.0	Aydınlık	100	319.2 ± 42.8	0	0	8.4 ± 4.6	8.4 ± 4.6	25.0 ± 8.8	54.2 ± 5.4	100
		Karanlık	91.7 ± 9.2	167.8 ± 15.0	0	8.3 ± 8.3	8.3 ± 8.3	20.8 ± 8.3	8.4 ± 4.6	54.2 ± 8.1	100
	4.0	Aydınlık	83.3 ± 3.7	154.0 ± 68.9	13.3 ± 5.9	3.3 ± 3.3	16.7 ± 6.0	6.7 ± 4.2	36.7 ± 8.2	26.7 ± 3.6	100
		Karanlık	58.3 ± 11.7	52.2 ± 11.7	0	41.7 ± 10.4	0	12.5 ± 4.4	29.2 ± 10.2	16.7 ± 6.7	100

Çizelge 4.32. Yalova İncisi üzüm çeşidinin sütlük eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
NN	0.5	Aydınlık	100	203.4 ± 9.1	0	0	30.0 ± 6.7	56.7 ± 7.6	13.3 ± 5.9	0	83.3 ± 7.5
		Karanlık	70.8 ± 14.2	107.6 ± 9.6	0	29.2 ± 14.6	16.7 ± 6.7	8.4 ± 4.6	20.9 ± 4.2	25.0 ± 15.0	95.0 ± 4.8
	1.0	Aydınlık	100	221.8 ± 59.5	0	0	23.3 ± 8.3	50.0 ± 11.2	16.7 ± 5.2	10.0 ± 6.7	80.0 ± 7.2
		Karanlık	87.5 ± 4.4	135.0 ± 12.1	0	12.5 ± 4.4	3.3 ± 3.3	45.9 ± 16.1	29.2 ± 13.1	8.4 ± 4.6	80.0 ± 16.0
	2.0	Aydınlık	90.0 ± 8.0	165.4 ± 14.8	0	10.0 ± 6.7	20.0 ± 6.3	45.8 ± 6.2	16.7 ± 5.2	16.7 ± 9.0	100
		Karanlık	95.8 ± 4.9	109.4 ± 9.8	0	4.2 ± 4.2	4.2 ± 4.2	29.2 ± 10.2	58.3 ± 11.7	4.2 ± 4.2	95.8 ± 4.8
	4.0	Aydınlık	100	126.2 ± 16.9	0	0	20.0 ± 9.8	33.3 ± 11.9	36.7 ± 11.5	10.0 ± 10.0	86.7 ± 11.6
		Karanlık	70.8 ± 17.7	60.4 ± 13.5	0	29.2 ± 19.0	4.2 ± 4.2	29.2 ± 13.1	29.2 ± 7.3	8.4 ± 4.6	100

Çizelge 4.33. Yalova İncisi üzüm çeşidinin sütlük eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus oranı, kallus ağırlığı, farklı derecelerde kallus oluşturma ile embriyojenik kallus oranları

Ortam	2,4-D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)						Embriyojenik kallus oranı (%)
					0	1	2	3	4	5	
B5	0.5	Aydınlık	100	325.4 ± 43.7	0	0	25.0 ± 5.0	54.2 ± 8.1	4.2 ± 4.2	16.7 ± 6.7	12.5 ± 4.4
		Karanlık	100	423.8 ± 37.9	0	0	25.0 ± 5.0	8.4 ± 4.6	8.4 ± 4.6	58.4 ± 5.8	54.2 ± 19.0
	1.0	Aydınlık	90.0 ± 8.0	521.0 ± 93.2	10.0 ± 10.0	0	23.3 ± 6.3	36.7 ± 14.8	0	37.5 ± 6.7	46.7 ± 12.5
		Karanlık	83.3 ± 12.5	383.0 ± 68.5	0	16.7 ± 11.7	8.4 ± 4.6	4.2 ± 4.2	12.5 ± 4.4	58.4 ± 14.6	87.5 ± 13.1
	2.0	Aydınlık	83.3 ± 8.3	225.6 ± 50.4	8.3 ± 8.3	8.3 ± 5.0	16.7 ± 6.7	50.0 ± 12.5	4.2 ± 4.2	12.5 ± 8.1	43.8 ± 15.3
		Karanlık	87.5 ± 8.8	165.8 ± 22.2	4.2 ± 4.2	8.3 ± 5.0	8.3 ± 5.0	8.3 ± 5.0	45.8 ± 13.7	37.5 ± 18.8	100
	4.0	Aydınlık	93.3 ± 8.3	173.2 ± 15.5	0	6.7 ± 6.7	20.0 ± 8.0	13.3 ± 5.9	33.3 ± 7.4	26.7 ± 9.6	83.3 ± 7.5
		Karanlık	75.0 ± 11.3	132.4 ± 35.5	8.3 ± 8.3	16.7 ± 6.7	8.3 ± 8.3	8.3 ± 8.3	37.5 ± 11.3	20.8 ± 8.3	100

4.1.5. Olgunlaşmamış Zigotik Embriyo Eksplantından Elde Edilen Bulgular**4.1.5.1. 41 B****4.1.5.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı**

41 B'nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantından elde edilen bulgular Çizelge 4.34, 4.35 ve 4.36'da gösterilmiştir.

Denemede kullanılan ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamaları incelendiğinde karanlıkta kültüre alınan eksplantların aydınlıktakilerden daha yüksek miktarda kallus oluşturduğu görülmektedir. Karanlıkta tutulan MS ortamına eklenen 2,4-D konsantrasyonu artarken kallus ağırlıklarında azalma saptanmıştır (sırasıyla 392.3 mg, 348.3 mg, 345.0 mg ve 266.1 mg). Karanlık uygulamalarında NN ortamına eklenen 0.5 mg/l 2,4-D (505.8 mg)'den 1 mg/l 2,4-D (514.6 mg)'ye doğru artan kallus ağırlığı, 1 mg/l 2,4-D'den 4 mg/l 2,4-D (344.7 mg)'ye doğru azalma göstermiştir. B5 ortamının karanlık kültürlerinde 2,4-D konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak kallus miktarlarında azalma gözlenmiştir (sırasıyla 2101.3 mg, 1239.8mg, 997.2 mg ve 633.4 mg). Ortalama kallus dereceleri incelendiğinde çoğunlukla 3 dereceli, az miktarda 2 dereceli, nadiren de 4 dereceli kallus oluşumu saptanmıştır. En düşük ortalama kallus derecesi 2.6 olarak 2 mg/l 2,4-D bulunduran MS ortamının aydınlığından, en yüksek ortalama kallus derecesi ise 4.1 olarak 0.5 mg/l 2,4-D bulunduran B5 ortamının karanlığından elde edilmiştir.

Farklı derecelerde kallus oluşturma oranları incelendiğinde, kararak canlılığını kaybeden eksplantların oranı (0 derece) uygulamalara göre değişmiş ve bu oran %10'u geçmemiştir. Canlı olan eksplantların tamamı kallus oluşturmuştur. İki dereceli kallus oluşumu %1.4 (B5 + 1 mg/l 2,4-D + karanlık) ile %36.3 (MS + 2 mg/l 2,4-D + aydınlık) arasında, 3 dereceli kallus oluşumu %40.5 (NN + 0.5 mg/l 2,4-D + karanlık) ile %80.6 (MS + 1 mg/l 2,4-D + aydınlık) arasında, 4 dereceli kallus oluşumu %0 (MS + 1 ve 4 mg/l 2,4-D + aydınlık) ile %31.3 (NN + 0.5 mg/l 2,4-D + karanlık) arasında, 5 dereceli kallus oluşumu ise %0 (MS + 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D + aydınlık) ile %43.1 (B5 + 0.5 mg/l 2,4-D + karanlık) arasında değişmiştir. Farklı derecelerde kallus oluşturma oranlarına genel olarak bakıldığında 3 dereceli kallus oluşum oranlarının diğer kallus derecelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.34. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Kültür koşulları	Kallus ağırlığı (mg)	Ortalama kallus derecesi (0 -5)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
MS	0.5	Aydınlık	272.8 ± 35.7	3.1 ± 0.1	3.5 ± 1.9	0	8.0 ± 3.8	70.8 ± 7.1	14.4 ± 3.5	3.3 ± 1.7
		Karanlık	392.3 ± 79.4	3.2 ± 0.1	10.0 ± 3.1	0	8.5 ± 4.0	59.8 ± 6.5	12.0 ± 2.4	9.7 ± 4.0
	1.0	Aydınlık	118.2 ± 10.8	2.9 ± 0	5.3 ± 2.5	0	14.1 ± 3.8	80.6 ± 4.3	0	0
		Karanlık	348.3 ± 61.2	3.2 ± 0.1	8.0 ± 3.8	0	14.9 ± 4.4	59.3 ± 6.7	10.5 ± 3.3	7.3 ± 2.7
	2.0	Aydınlık	82.7 ± 12.4	2.6 ± 0.1	3.3 ± 1.7	0	36.3 ± 5.9	59.4 ± 5.9	1.0 ± 1.0	0
		Karanlık	345.0 ± 59.3	3.2 ± 0.1	9.2 ± 4.8	0	12.3 ± 5.3	64.9 ± 6.9	3.1 ± 2.0	10.5 ± 3.1
	4.0	Aydınlık	59.4 ± 6.4	2.7 ± 0.1	9.5 ± 3.6	0	30.1 ± 4.9	60.4 ± 5.9	0	0
		Karanlık	266.1 ± 55.7	3.1 ± 0.1	4.0 ± 2.8	0	14.2 ± 4.5	66.7 ± 5.8	10.7 ± 2.7	4.4 ± 3.2

Çizelge 4.35. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Kültür koşulları	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Ortalama kallus derecesi (0 -5)	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
NN	0.5	Aydınlık	424.6 ± 57.0	3.3 ± 0.1	5.3 ± 2.3	0	12.8 ± 4.6	55.4 ± 7.5	17.4 ± 4.6	9.1 ± 3.2
		Karanlık	505.8 ± 48.1	3.5 ± 0.1	8.8 ± 3.6	0	9.31 ± 2.5	40.5 ± 4.7	31.3 ± 4.6	10.3 ± 3.0
	1.0	Aydınlık	201.5 ± 48.4	3.0 ± 0.1	8.1 ± 4.0	0	12.3 ± 4.9	67.6 ± 9.4	7.5 ± 5.2	4.5 ± 2.9
		Karanlık	514.6 ± 65.2	3.5 ± 0.1	0	0	2.3 ± 2.3	61.8 ± 6.3	20.9 ± 5.4	15.0 ± 4.8
	2.0	Aydınlık	174.6 ± 28.4	2.9 ± 0.1	1.3 ± 1.3	0	18.1 ± 4.6	72.9 ± 4.8	6.0 ± 3.6	1.7 ± 1.7
		Karanlık	416.8 ± 55.7	3.2 ± 0.1	0	0	17.2 ± 4.6	55.0 ± 7.0	17.1 ± 3.5	10.7 ± 3.9
	4.0	Aydınlık	167.9 ± 41.0	2.9 ± 0.1	4.6 ± 2.4	0	19.3 ± 6.6	66.9 ± 6.8	7.7 ± 5.2	1.5 ± 1.5
		Karanlık	344.7 ± 56.1	3.2 ± 0.1	9.1 ± 3.1	0	9.1 ± 7.3	60.0 ± 8.5	20.0 ± 6.6	1.8 ± 1.8

Çizelge 4.36. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturna oranları

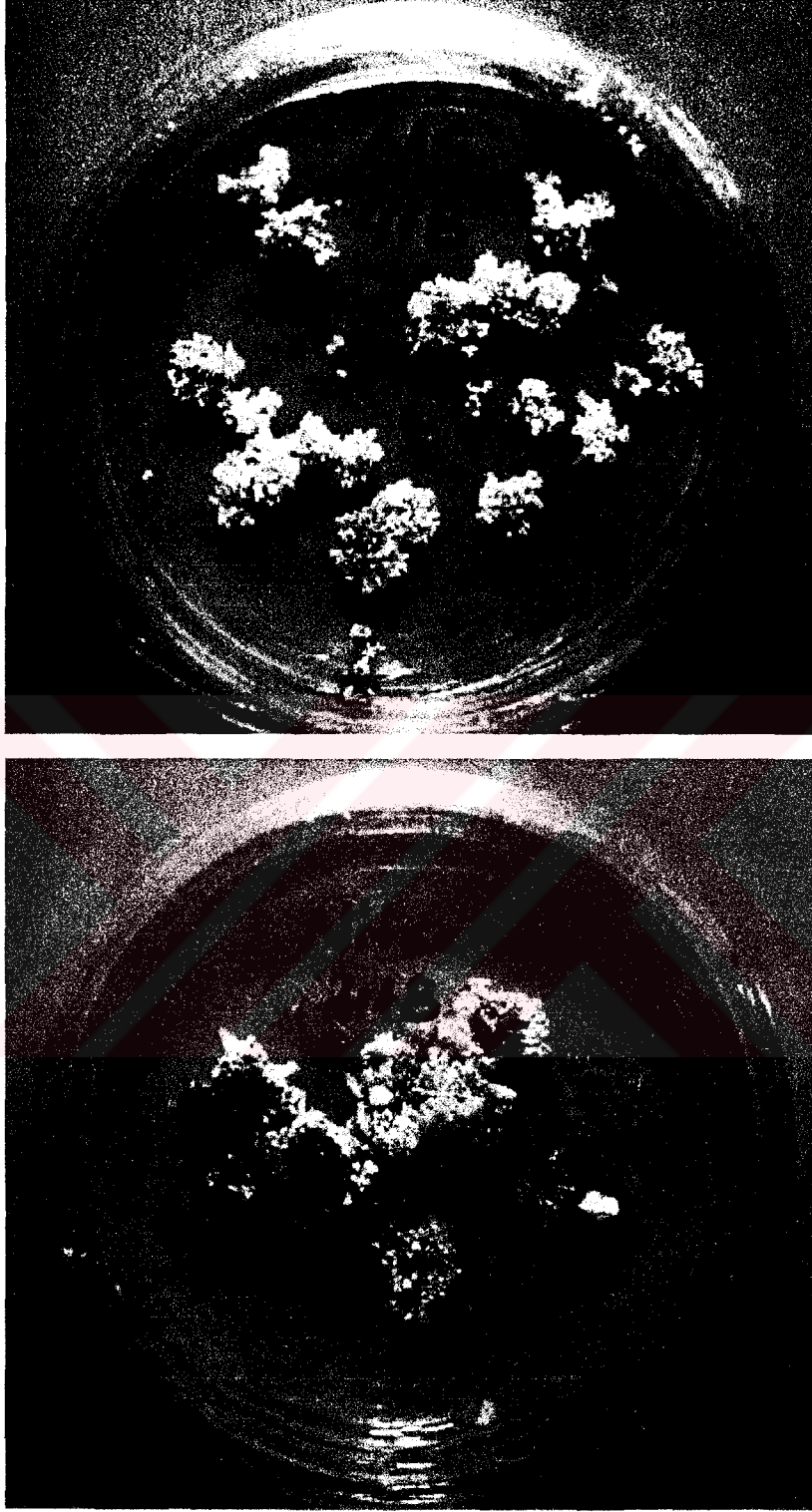
Ortam	2,4 D mg/l	Kültür koşulları	Kallus ağırlığı (mg/eksplant)	Ortalama kallus derecesi (0 -5)	Farklı derecelerde kallus oluşturna oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
B5	0.5	Aydınlık	525.7 ± 119.9	3.2 ± 0.1	2.4 ± 1.6	0	11.5 ± 3.4	68.4 ± 4.4	4.4 ± 2.0	13.3 ± 3.7
		Karanlık	2101.3 ± 419.6	4.1 ± 0.2	0	0	1.5 ± 1.5	46.7 ± 7.6	12.3 ± 5.2	43.1 ± 8.7
	1.0	Aydınlık	329.7 ± 67.9	3.1 ± 0.1	0	0	12.9 ± 5.0	72.1 ± 6.9	7.5 ± 2.8	7.5 ± 2.8
		Karanlık	1239.8 ± 202.1	3.8 ± 0.1	4.3 ± 2.2	0	1.4 ± 1.4	47.6 ± 5.4	15.6 ± 5.0	31.1 ± 4.8
	2.0	Aydınlık	288.7 ± 48.0	3.1 ± 0.1	0	0	8.4 ± 3.4	78.4 ± 5.5	7.7 ± 3.0	5.5 ± 1.9
		Karanlık	997.2 ± 215.9	3.7 ± 0.2	0	0	1.7 ± 1.7	55.8 ± 8.7	17.5 ± 5.3	27.3 ± 6.1
	4.0	Aydınlık	491.4 ± 149.9	3.2 ± 0.1	3.7 ± 2.7	0	11.0 ± 3.6	70.8 ± 5.3	3.5 ± 1.8	11.0 ± 3.1
		Karanlık	633.4 ± 98.3	3.5 ± 0.1	1.2 ± 1.2	0	9.5 ± 3.5	54.3 ± 6.2	14.6 ± 4.7	20.4 ± 4.5

Çizelge 4.37'de verilen kallus oluşturan eksplantların oranı incelendiğinde MS ortamındaki eksplantların %90.0 ve üzerinde, NN ortamında %90.9 ve üzerinde, B5 de ise %95.7 ve üzerinde kallus oluşturma oranlarına sahip oldukları görülmektedir. En yüksek kallus oranı MS ortamında %96.7, NN ve B5 de ise %100 olarak belirlenmiştir. Denemede kullanılan tüm uygulamalarda meydana gelen kallusların tamamının (%100 oranında) embriyojenik kapasiteye sahip oldukları saptanmıştır.

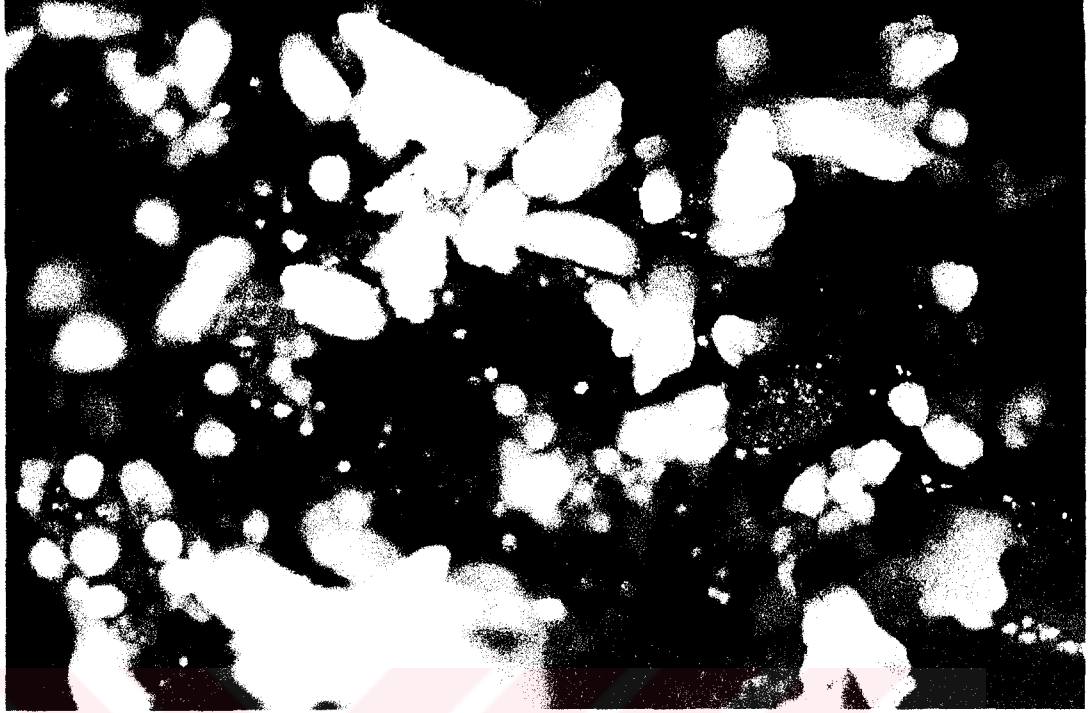
4.1.5.1.(2). Embriyo Uyartımı

Çizelge 4.37'de verilen embriyo oluşturan eksplantların oranının MS ortamının karanlık uygulamalarında aydınlıktan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu oran karanlıkta artan 2,4-D konsantrasyonlarının tersine azalmıştır (sırasıyla %22.7, %21.5, %12.0 ve %6.7). Aydınlık koşullarda da aynı eğilim izlenmektedir (sırasıyla %9.4, %3.5, %3.8 ve %2.4). NN ortamının karanlık uygulamalarında 0.5 (%20), 1 mg/l 2,4-D (%24.3) ve 2 mg/l 2,4-D (%25.5) ekli olanlarda yüksek çıkmış ancak, 4 mg/l 2,4-D (%8) de düşük çıkmıştır. MS ve NN ortamlarının tam tersine B5 ortamının karanlık kültürlerinde 2,4-D konsantrasyonlarının artışına ters olarak embriyo oluşturan eksplant oranları azalmıştır (sırasıyla %30.0, %28.9, %23.2 ve %5). En yüksek oranda embriyo oluşturan eksplantlar B5 ortamının karanlık uygulamalarından özellikle de 0.5 mg/l 2,4-D'nin bulunduğu kültürlerde %30.0 oranında elde edilmiştir (**Şekil 4.3**).

41 B'nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından elde edilen farklı aşamadaki somatik embriyolara (**Şekil 4.4**) ilişkin bulgular **Çizelge 4.38'**de sunulmuştur. Çizelgeden de takip edilebileceği gibi globular şekilli embriyo denemedeki tüm ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarında ve karanlık uygulamalarında aydınlıktan daha fazla sayıda oluşmuştur. MS ortamında 2,4-D konsantrasyonlarına göre değişmek üzere globular embriyo oluşumu (**Şekil 4.5**) karanlık uygulamalarında 4, 0.5, 2 ve 1 mg/l 2,4-D bulunan ortamlarda, sırasıyla 871, 776, 775, 166 adet; NN de 4, 2, 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D bulunan ortamlarda sırasıyla 771, 580, 534 ve 500 adet, B5 de 0.5, 4, 2 ve 1 mg/l 2,4-D'li ortamlarda sırasıyla 971, 839, 603 ve 560 adet olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embryo eksplantlarından farklı ortamlarda meydana gelen somatik embriyolar

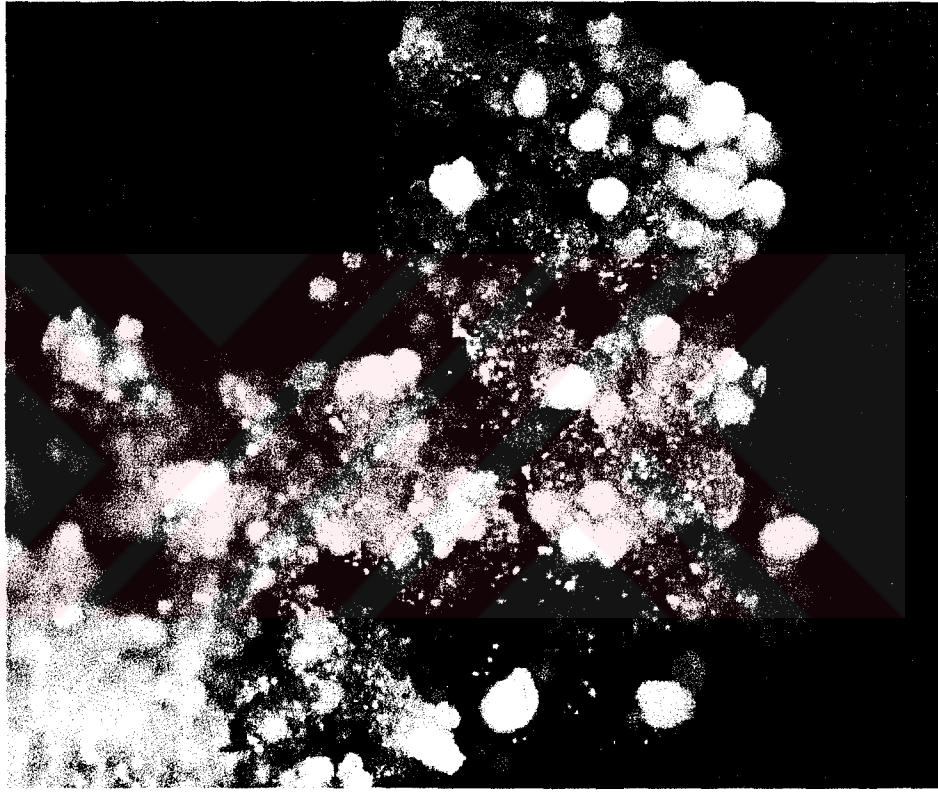


Şekil 4.4. Farklı devrelerde bulunan somatik embriyolar



Şekil 4.5. Globular şekilli somatik embriyolar

Kalp devresindeki embriyo (Şekil 4.6) oluşumunda da karanlıktaki uygulamaların aydınlıktan daha yüksek değerler verdiği saptanmıştır. Karanlık uygulaması yapılan ortamlar içerisinde bu bakımdan en yüksek değerleri (879 adet) MS ortamına eklenen 2 mg/l 2,4-D, en düşük değeri (248 adet) 1 mg/l 2,4-D bulunanlar vermiştir. NN ortamında karanlıktaki kültürlerde 304 (2 mg/l 2,4-D) ile 544 adet (0.5 mg/l 2,4-D) arasında, B5 de ise 410 (4 mg/l 2,4-D) ile 658) adet (2 mg/l 2,4-D arasında değişen sayılarda kalp şekilli embriyolar oluşmuştur.



Şekil 4.6. Kalp şekilli somatik embriyolar

Torpedo devresine (Şekil 4.7) gelmiş embriyo sayısı bakımından denemede kullanılan tüm uygulamalarda karanlıktakilerin aydınlıktan daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Karanlıkta tutulan ortamlardan 1 mg/l 2,4-D bulunduran B5 ortamı içerisinde torpedo devresinde somatik embriyo oluşumunun 559 adet ile en yüksek düzeyde meydana geldiği saptanmıştır. İkinci sırayı 385 adet ile 4 mg/l 2,4-D bulunduran B5 ortamı almıştır. NN ve MS ortamlarında torpedo aşamasındaki en

yüksek embriyo sayısı sırasıyla 370 adet ve 186 adet ile 0.5 mg/l 2,4-D bulunduran karanlıktaki uygulamalarda tespit edilmiştir. Aydınlik uygulamalarında değerler, MS ortamında 0.5, 2 ve 40 mg/l 2,4-D bulunanlarda 8 adet 1 mg/l 2,4-D de 24 adet olarak, NN ortamında 2,4-D konsantrasyonlarının artışına paralel olarak 46 (0.5 mg/l 2,4-D) ile 162 (4 mg/l 2,4-D) adet arasında, B5 ortamında ise 0 adet (0.5 ve 4 mg/l 2,4-D) ile 203 (1 mg/l 2,4-D) adet arasında değişen sayılarda torpedo devresinde embriyolar saptanmıştır.



Şekil 4.7. Torpedo şekilli somatik embriyolar

Çizelge 4.37. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, embriyojenik kallus ve embriyo oluşturan eksplantların oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus olusturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus olusturan eksplantların oranı (%)	Embriyo olusturan eksplantların oranı (%)
MS	0.5	Aydınlık	96.5 ± 1.9	100	9.4 ± 4.1
		Karanlık	90.0 ± 3.1	100	22.7 ± 4.7
	1.0	Aydınlık	94.7 ± 2.5	100	3.5 ± 1.9
		Karanlık	92.0 ± 3.8	100	21.5 ± 6.2
	2.0	Aydınlık	96.7 ± 1.7	100	3.8 ± 2.7
		Karanlık	90.8 ± 4.8	100	12.0 ± 3.8
	4.0	Aydınlık	90.5 ± 3.6	100	2.4 ± 1.6
		Karanlık	96.0 ± 2.9	100	6.7 ± 3.2
NN	0.5	Aydınlık	94.7 ± 2.4	100	16.7 ± 4.9
		Karanlık	91.2 ± 3.6	100	20.0 ± 5.0
	1.0	Aydınlık	91.9 ± 4.0	100	7.7 ± 3.8
		Karanlık	100	100	24.3 ± 6.4
	2.0	Aydınlık	98.7 ± 1.3	100	8.9 ± 3.7
		Karanlık	100	100	25.5 ± 6.1
	4.0	Aydınlık	95.4 ± 2.4	100	6.7 ± 2.5
		Karanlık	90.9 ± 3.1	100	8.0 ± 3.3
B5	0.5	Aydınlık	97.6 ± 1.6	100	1.1 ± 1.1
		Karanlık	100	100	30.0 ± 5.4
	1.0	Aydınlık	100	100	5.0 ± 2.3
		Karanlık	95.7 ± 2.3	100	28.9 ± 5.4
	2.0	Aydınlık	100	100	2.1 ± 1.5
		Karanlık	100	100	23.2 ± 4.1
	4.0	Aydınlık	96.3 ± 2.7	100	0
		Karanlık	98.8 ± 1.2	100	5.0 ± 2.9

Çizelge 4.38. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların farklı aşamalarındaki sayıları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Globular şekilli embriyo sayısı	Kalp şekilli embriyo sayısı	Torpedo şekilli embriyo sayısı
MS	0.5	Aydınlık	60 ± 0	6 ± 0	8 ± 0
		Karanlık	776 ± 543	346 ± 185	186 ± 64
	1.0	Aydınlık	32 ± 0	10 ± 5	24 ± 2
		Karanlık	166 ± 43	248 ± 135	90 ± 42
	2.0	Aydınlık	100 ± 0	16 ± 0	8 ± 0
		Karanlık	775 ± 608	879 ± 791	157 ± 71
	4.0	Aydınlık	126 ± 119	29 ± 16	8 ± 2
		Karanlık	871 ± 266	820 ± 328	169 ± 75
NN	0.5	Aydınlık	251 ± 188	92 ± 49	46 ± 30
		Karanlık	534 ± 148	544 ± 182	370 ± 110
	1.0	Aydınlık	326 ± 160	203 ± 145	86 ± 43
		Karanlık	500 ± 180	349 ± 152	166 ± 50
	2.0	Aydınlık	158 ± 33	139 ± 52	153 ± 59
		Karanlık	580 ± 236	304 ± 144	314 ± 173
	4.0	Aydınlık	567 ± 196	287 ± 162	162 ± 82
		Karanlık	771 ± 277	347 ± 114	135 ± 26
B5	0.5	Aydınlık	323 ± 0	0	0
		Karanlık	971 ± 645	551 ± 366	98 ± 51
	1.0	Aydınlık	298 ± 175	519 ± 95	203 ± 16
		Karanlık	560 ± 143	485 ± 143	559 ± 230
	2.0	Aydınlık	34 ± 18	122 ± 36	50 ± 4
		Karanlık	603 ± 289	658 ± 313	253 ± 66
	4.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	839 ± 65	410 ± 319	385 ± 172

4.1.5.1.(3). Embriyo Çimlenmesi

Somatik embriyogenesis çalışmalarının en önemli aşamalarından birisi de elde edilen embriyoların çimlendirilmesi ve bitkiye dönüştürülmesidir (Şekil 4.8 ve 4.9).

Somatik embriyolar meydana geldikleri başlangıç besin ortamlarının hormonsuzuna aktarıldığında, farklı oranlarda çimlenme gösterdikleri belirlenmiştir. Torpedo devresindeki somatik embriyoların NN ortamında %58.0'i, MS ortamında %53.6'sı ve B5 ortamında %51.8'i çimlenmiş ve tam bitki oluşumu MS ve NN ortamında %75, B5 ortamında %60.7 oranında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.39).

Çizelge 4.39. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların aydınlık koşullarda çimlenme ve tam bitkiye dönüşme oranları

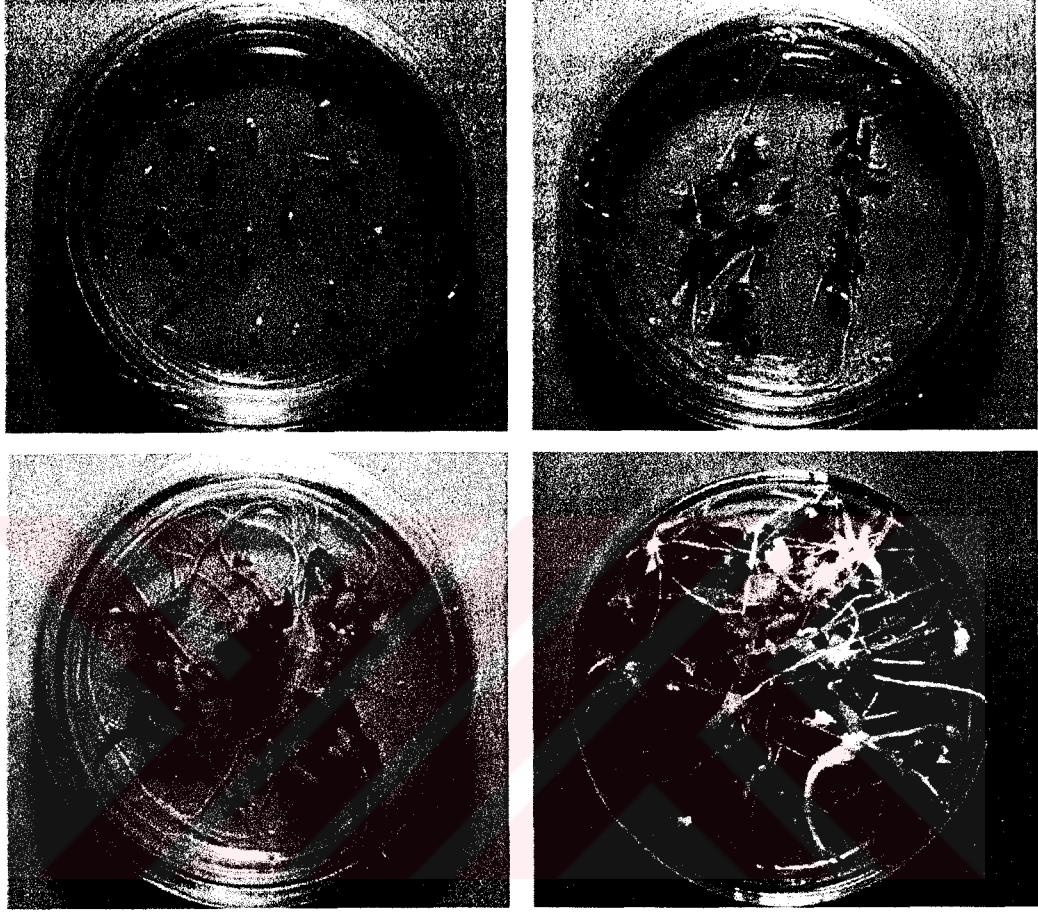
Ortam	Toplam embriyo sayısı (n)	Çimlenme oranı (%)	Bitki sayısı (n)	Tam bitkiye dönüşme oranı (%)
MS	55	53.6 ± 3.4	21	75.0 ± 24.9
NN	71	58.0 ± 7.6	20	75.0 ± 24.9
B5	54	51.8 ± 18.5	19	60.7 ± 10.7

4.1.5.2. Yalova İncisi

4.1.5.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı

Yalova İncisinin farklı 2,4-D konsantrasyonlarını içeren MS ve NN ortamlarında ve aydınlıkta tutulan olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantları karanlıktan daha yüksek kallus ağırlığı değerleri vermiştir (Çizelge 4.40 ve 4.41). Kallus miktarı aydınlık uygulamalarda MS'e eklenen 0.5 mg/l 2,4-D (98.4 mg) den 1 mg/l 2,4-D (119.5 mg) ye doğru bir artış göstermesine rağmen bu noktadan sonra 4 mg/l 2,4-D (47.3 mg) ye doğru hızlı bir azalma göstermiştir. NN ortamında 0.5 mg/l 2,4-D (69.8 mg) den 2 mg/l 2,4-D (245.3 mg) ye doğru bir artış gözlenmiş ve en

düşük değer 4 mg/l 2,4-D'de (9.5 mg) saptanmıştır. B5 ortamının karanlık uygulamalarında aydınlıktan daha yüksek miktarda kallus elde edilmiştir.



Şekil 4.8. 41 B'nin çimlenen somatik embriyoları



Şekil 4.9. 41 B'nin çimlenen somatik embriolarında farklı gelişme durumları

B5 ortamındaki en yüksek kallus miktarı 588.6 mg ile 2 mg/l 2,4-D ve bunu takiben 323.5 mg ile 1 mg/l 2,4-D'nin karanlık uygulamalarında saptanmıştır. Denemedeki tüm uygulamalarda kallus derecesinin 2.7 (MS + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlık) nin altında olduğu görülmüştür. En düşük kalus derecesi 1.2 (B5 + 4 mg/l 2,4-D + karanlık) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.40 ve 4.42).

Eksplantlarda kararına (0 dereceli kallus oluşumu) MS ortamında 0.5 ve 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde sırasıyla %1.8 ve %7, 1 mg/l 2,4-D + aydınlık uygulamasında %7.5, NN'de 2 ve 4 mg/l 2,4-D bulunan karanlık uygulamalarında %2 oranında, B5' de 4.0 mg/l 2,4-D (%3.3)'nin aydınlığında ve 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/l 2,4-D'nin karanlığında (sırasıyla %5.9, %6.0 ve %7.0) meydana gelmiştir. En yüksek oranda 1 dereceli kallus oluşumu 4 mg/l 2,4-D eklenen MS, NN ve B5 ortamlarının karanlık kültürlerinde sırasıyla %42.5, %34.0 ve %69.2 oranlarında saptanmıştır. Farklı derecelerde kallus oluşturma oranları bakımından tüm uygulamalar birlikte incelendiğinde en yüksek oranların 2 dereceli kallus oluşumunda olduğu ve bunu 3 dereceli kallus oluşumunun izlediği Çizelge 4.40, 4.41 ve 4.42'de görülmektedir. En yüksek oranda iki dereceli kallus oluşumu MS ortamında %96.7 (2 mg/l 2,4-D + aydınlık), NN ortamında %94.0 (2 mg/l 2,4-D + karanlık) ve B5 ortamında %77.5 (1 mg/l 2,4-D + aydınlık) oranında meydana gelmiştir. Üç dereceli kallus oluşumu %0 -

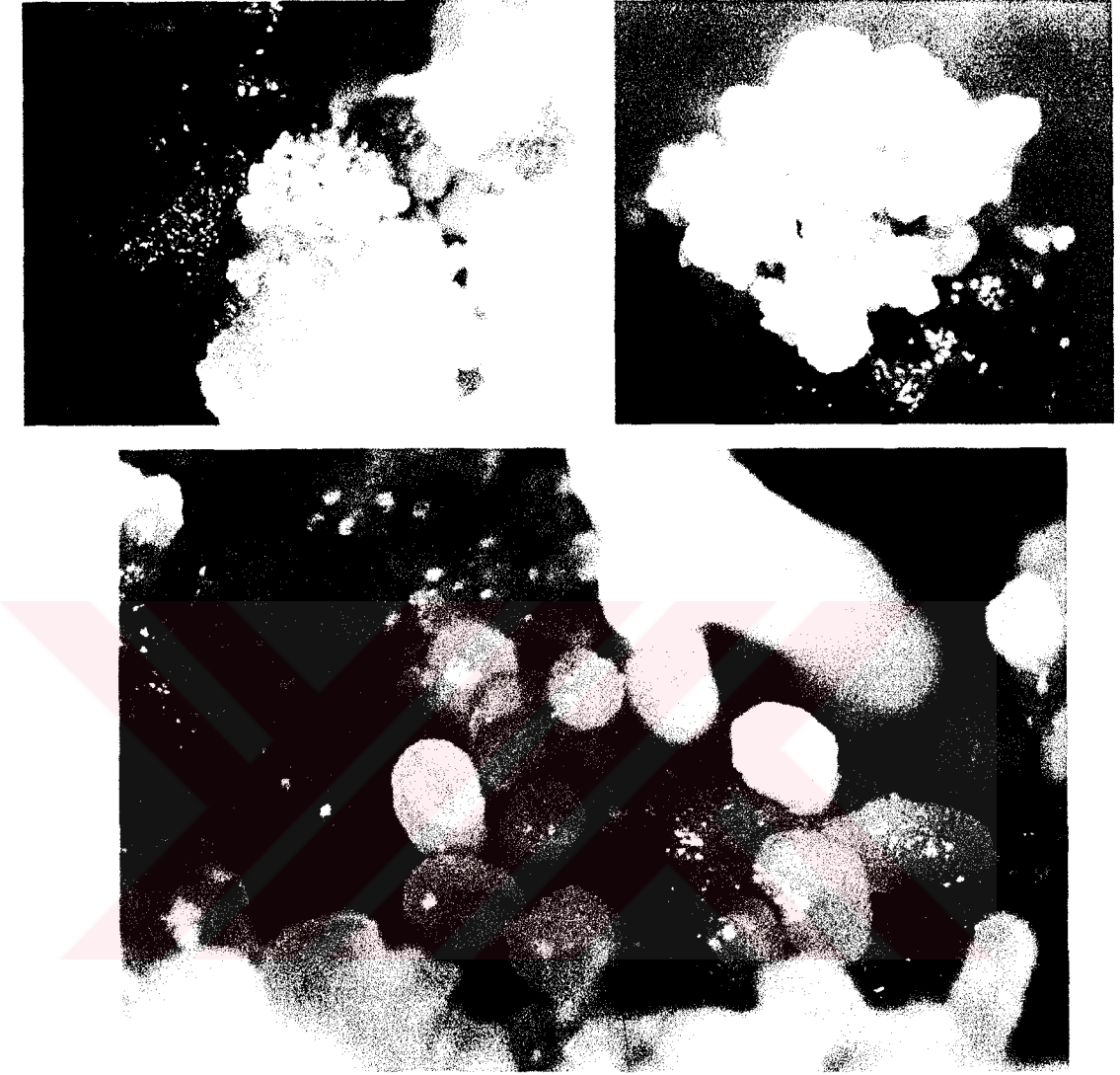
%62.0, 4 dereceli kallus oluşumu %0 - %5.7, 5 dereceli kallus oluşumu ise %0 - %8.0 arasında değişen oranlarda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.40, 4.41 ve 4.42).

Kallus oluşturan eksplantların oranının MS'e eklenen 4.0 mg/l 2,4-D'nin karanlık kültürlerinde %50.5 oranında, bunun dışındaki 2,4-D uygulamalarında ise oranın %90 ve üzerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.43). Bu değerler NN ortamında 4 mg/l 2,4-D uygulamasının aydınlığında %80 ve karanlığında %64 oranında, diğer 2,4-D uygulamalarının aydınlık ve karanlığında ise %98 ve üzerinde değişen oranlarda saptanmıştır. B5 ortamında 4 mg/l 2,4-D + aydınlıkta %38.3 ve karanlıkta %23.8 oranında, bunun dışındaki uygulamalarda %71.5 ve üzerinde olmuştur. Çizelge 4.43'den de görülebileceği gibi denenen tüm ortamlarda 4 mg/l 2,4-D uygulaması her iki ışık koşullarında da en olumsuz sonuçları oluşturmuştur. Bütün uygulamalarda meydana gelen kallusların tamamının embriyojenik kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir

4.1.5.2.(2). Embriyo Uyartımı

Embriyo oluşumu yalnızca 1 mg/l 2,4-D bulunan MS'in aydınlık ve 0.5 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamının aydınlık ve karanlık kültürlerinde gözlenmiştir. 1 mg/l 2,4-D bulunan MS'in aydınlık kültürlerinde %5, 0.5 mg/l 2,4-D bulunan NN'in aydınlık kültürlerinde %6.3, karanlık kültürlerinde %2.3 oranında embriyo oluşumu belirlenmiştir (Çizelge 4.43).

Bu embriyolardan globular, kalp ve torpedo devresinde olanların sayısı sırasıyla MS + 1 mg/l 2,4-D + aydınlıkta 2032, 2211 ve 981 adet olarak bulunmuştur. Benzer sırayla NN + 0.5 mg/l 2,4-D + aydınlıkta 997, 1530 ve 912; NN + 0.5 mg/l 2,4-D + karanlıkta 276.5, 284 ve 108 adet olarak değişik devrelerde embriyo saptanmıştır (Şekil 4.10) (Çizelge 4.44) .



Şekil 4.10. Yalova İncisinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarından elde edilen farklı devrelerdeki somatik embriyolar

Çizelge 4.40. Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında MS ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus ağırlığı (mg)	Kallus derecesi	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
MS	0.5	Aydınlık	98.4 ± 18.1	2.7 ± 0.1	0	0	36.0 ± 5.6	62.0 ± 5.3	2.0 ± 2.0	0
		Karanlık	86.7 ± 45.0	2.5 ± 0.1	1.8 ± 1.8	1.8 ± 1.8	47.0 ± 9.7	47.6 ± 9.6	0	1.8 ± 1.8
	1.0	Aydınlık	119.5 ± 60.4	2.5 ± 0.1	7.5 ± 7.5	2.5 ± 2.5	46.3 ± 5.9	43.7 ± 7.7	0	0
		Karanlık	24.3 ± 3.8	2.2 ± 0.1	0	0	82.5 ± 5.8	15.0 ± 5.0	2.5 ± 2.5	0
	2.0	Aydınlık	15.7 ± 2.6	2.0 ± 0	0	0	96.7 ± 3.2	3.3 ± 3.3	0	0
		Karanlık	11.1 ± 1.7	1.9 ± 0.1	0	8.6 ± 4.1	88.6 ± 4.0	2.8 ± 2.8	0	0
	4.0	Aydınlık	7.3 ± 0.6	1.8 ± 0	0	20.0 ± 0	80.0 ± 0	0	0	0
		Karanlık	4.4 ± 0.6	1.4 ± 0.1	7.0 ± 3.6	42.5 ± 5.1	50.5 ± 6.1	0	0	0

Çizelge 4.41. Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında NN ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus ağırlığı (mg)	Kallus derecesi	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
NN	0.5	Aydınlık	69.8 ± 22.3	2.5 ± 0.1	0	0	60.0 ± 1.2	35.0 ± 15.8	5.0 ± 5.0	0
		Karanlık	65.6 ± 17.8	2.4 ± 0.1	0	1.8 ± 1.8	65.0 ± 8.4	27.7 ± 8.2	5.5 ± 2.8	0
	1.0	Aydınlık	240.7 ± 182.0	2.5 ± 0.2	0	0	65.7 ± 12.9	25.7 ± 8.5	5.7 ± 3.7	2.9 ± 2.8
		Karanlık	27.7 ± 8.6	2.1 ± 0.1	0	0	90.0 ± 7.0	10.0 ± 6.8	0	0
	2.0	Aydınlık	245.3 ± 219.4	2.5 ± 0.3	0	0	68.0 ± 18.6	24.0 ± 11.7	0	8.0 ± 8.0
		Karanlık	16.5 ± 4.0	2.0 ± 0.1	2.0 ± 2.0	0	94.0 ± 3.0	4.0 ± 2.7	0	0
	4.0	Aydınlık	9.5 ± 4.9	1.9 ± 0.1	0	20.0 ± 8.2	75.0 ± 9.8	5.0 ± 5.0	0	0
		Karanlık	4.6 ± 0.7	1.6 ± 0.1	2.0 ± 2.0	34.0 ± 9.5	64.0 ± 10.3	0	0	0

Çizelge 4.42. Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında B5 ortamı, farklı 2,4-D konsantrasyonu ve kültür koşullarında elde edilen kallus ağırlığı, ortalama kallus derecesi ve farklı derecelerde kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus ağırlığı (mg)	Kallus derecesi	Farklı derecelerde kallus oluşturma oranı (%)					
					0	1	2	3	4	5
B5	0.5	Aydınlık	47.1 ± 22.8	2.2 ± 0.1	0	5.7 ± 3.7	65.0 ± 8.2	26.4 ± 7.1	2.8 ± 2.8	0
		Karanlık	140.9 ± 70.5	2.4 ± 0.2	5.9 ± 4.0	15.5 ± 5.9	25.5 ± 6.8	47.7 ± 8.5	3.6 ± 2.4	1.8 ± 1.8
	1.0	Aydınlık	124.1 ± 102.3	2.3 ± 0.1	0	2.5 ± 2.5	77.5 ± 8.8	15.0 ± 8.2	2.5 ± 2.5	2.5 ± 2.5
		Karanlık	323.5 ± 169.3	2.3 ± 0.3	0	23.13 ± 7.9	38.1 ± 10.1	30.6 ± 12.5	3.1 ± 3.1	5.0 ± 3.3
	2.0	Aydınlık	19.6 ± 5.3	1.9 ± 0.1	0	22.9 ± 9.2	68.6 ± 9.6	8.5 ± 4.1	0	0
		Karanlık	588.6 ± 320.1	2.4 ± 0.3	6.0 ± 3.1	22.5 ± 9.2	35.0 ± 10.9	17.0 ± 5.1	4.5 ± 3.0	15.0 ± 7.8
	4.0	Aydınlık	13.6 ± 6.8	1.5 ± 0.2	3.3 ± 3.3	58.4 ± 13.8	25.0 ± 17.0	13.3 ± 8.4	0	0
		Karanlık	2.5 ± 0.3	1.2 ± 0.1	7.0 ± 3.9	69.2 ± 6.0	23.8 ± 5.8	0	0	0

Çizelge 4.43. Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, embriyojenik kallus ve embriyo oluşturan eksplantların oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus olusturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus olusturan eksplantların oranı (%)	Embriyo olusturan eksplantların oranı (%)
MS	0.5	Aydınlık	100	100	0
		Karanlık	96.4 $\pm$ 2.3	100	0
	1.0	Aydınlık	90.0 $\pm$ 10.0	100	5.0 $\pm$ 2.9
		Karanlık	100	100	0
	2.0	Aydınlık	100	100	0
		Karanlık	91.4 $\pm$ 4.2	100	0
	4.0	Aydınlık	80 $\pm$ 0	100	0
		Karanlık	50.5 $\pm$ 6.1	100	0
	NN	0.5	Aydınlık	100	6.3 $\pm$ 6.3
			Karanlık	98.2 $\pm$ 1.8	2.3 $\pm$ 2.3
		1.0	Aydınlık	100	0
			Karanlık	100	0
		2.0	Aydınlık	100	0
			Karanlık	98.0 $\pm$ 1.9	0
		4.0	Aydınlık	80.0 $\pm$ 8.0	0
			Karanlık	64.0 $\pm$ 10.3	0
B5	0.5	Aydınlık	94.3 $\pm$ 3.6	100	0
		Karanlık	78.6 $\pm$ 7.6	100	0
	1.0	Aydınlık	97.5 $\pm$ 2.4	100	0
		Karanlık	76.9 $\pm$ 7.9	100	0
	2.0	Aydınlık	77.1 $\pm$ 9.3	100	0
		Karanlık	71.5 $\pm$ 9.0	100	0
	4.0	Aydınlık	38.3 $\pm$ 15.2	100	0
		Karanlık	23.8 $\pm$ 5.8	100	0

Çizelge 4.44. Yalova İncisinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyoların farklı devrelerdeki sayıları

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Globular şekilli embriyo sayısı	Kalp şekilli embriyo sayısı	Torpedo şekilli embriyo sayısı
MS	0.5	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	1.0	Aydınlık	2032 ± 317	2211 ± 587	981 ± 113
		Karanlık	0	0	0
	2.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	4.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
NN	0.5	Aydınlık	997 ± 881	1530 ± 790	912 ± 393
		Karanlık	276.5 ± 122	284 ± 109	108 ± 19
	1.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	2.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	4.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
B5	0.5	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	1.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	2.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0
	4.0	Aydınlık	0	0	0
		Karanlık	0	0	0

4.1.5.2.(3). Embriyo Çimlenmesi

Yalova İncisi üzüm çeşidinden elde edilen torpedo devresindeki somatik embriyolar başlangıç ortamlarının hormonsuzuna yerleştirildiğinde MS'de %77.4 ve NN'de %74.3 oranında çimlenmişlerdir. Tam bitkiye dönüşüm oranı MS'te %45.0 ve NN ortamında %38.5 düzeyinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.45).

Çizelge 4.45. Yalova İncisi üzüm çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve koşullarda elde edilen somatik embriyolarda çimlenme ve tam bitkiye dönüşme oranları

Ortam	Toplam embriyo sayısı (n)	Çimlenme oranı (%)	Bitki sayısı (n)	Tam bitkiye dönüşme oranı (%)
MS	19	77.4 ± 6.0	7	45.0 ± 5.1
NN	36	74.3 ± 12.3	11	38.5 ± 6.5

4.1.6. Olgunlaşmış Zigotik Embriyo Eksplantından Elde Edilen Bulgular

4.1.6.1. 41 B

4.1.6.1.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı

Çizelge 4.46 dan da görülebileceği gibi 41 B'nin olgun zigotik embriyo eksplantlarından birinci yıl çok düşük oranlarda kallus oluşturulabilmiştir. Denemede kullanılan ortamlarda bazı 2,4-D konsantrasyonlarının yalnızca karanlık kültürlerinden kallus elde edilebilmiştir. 2 ve 4 mg/l 2,4-D eklenen MS ortamından %5.0 ve %11.1; 0.5, 1 ve 4 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamında sırasıyla %5.6, %33.3 ve %3.3; 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D eklenen B5 ortamında %20.9 ve %20.0 oranında kallus meydana geldiği saptanmıştır. Bu ortamlarda meydana gelen kallusların tamamının embriyojenik kalluslar olduğu belirlenmiştir.

Olgun zigotik embriyo eksplantlarından değişik ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarında birinci yıl çok düşük oranda kallus meydana gelmesi nedeniyle ikinci yılda tohumların 6 hafta katlamaya alınmasından sonra izole edilen olgun

zigotik embriyo eksplantları kullanılmıştır. Bunlardan elde edilen bulgular **Çizelge 4.47**'de sunulmuştur. Çizelgeden de görülebileceği gibi bu uygulama ile denemede kullanılan ortam, 2,4-D ve büyütme koşullarına göre değişen oranlarda kallus oluşumu arttırılabilmektedir. Kallus oluşturan eksplantların oranı MS ortamında %70.9 (4 mg/l 2,4-D + aydınlık) ile % 100 (0.5 mg/l 2,4-D + karanlık), NN ortamında %54.2 (4 mg/l 2,4-D + aydınlık) ile %100 (1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D + karanlık) arasında değişmiştir. B5 ortamında 0.5, 1 ve 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık kültürlerinde %83.4 oranında, B5'in bunun dışındaki uygulamalarında ise eksplantların %100 oranında kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından tüm uygulamalar karşılaştırıldığında en yüksek kallus ağırlığı B5 ortamında 1 mg/l 2,4-D'nin aydınlığından 82.5 mg, 4 mg/l 2,4-D'nin karanlığından ise 80.8 mg olarak belirlenmiştir. En az kallus ağırlığı 4 mg/l 2,4-D bulunan NN ortamının aydınlıktaki kültürlerinden 10.9 mg olarak tespit edilmiştir. Farklı ortam, 2,4-D ve kültür koşullarında meydana gelen kallusların tamamının embriyojenik kapasiteye sahip oldukları belirlenmiştir.

4.1.6.1.(2). Embriyo Uyartımı

Embriyojenik kalluslar oluştukları ortamda üç ay bekletildiklerinde veya aynı ortamların hormonsuzuna yerleştirilip ayda bir alt kültüre alındıklarında da embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.46. 41 B asma anacının olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus ve embriyojenik kallus oluşturma oranları (1999 yılı)

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus oranı (%)
MS	0.5	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	1.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	2.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	5.0 ± 3.5	100
	4.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	11.1 ± 4.8	100
NN	0.5	Aydınlık	0	0
		Karanlık	5.6 ± 5.5	100
	1.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	33.3 ± 9.6	100
	2.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	4.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	3.3 ± 3.3	100
B5	0.5	Aydınlık	0	0
		Karanlık	20.9 ± 4.2	100
	1.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	20.0 ± 9.8	100
	2.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0
	4.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	0	0

Çizelge 4.47. 41 B asma anacının 6 hafta katlamaya alınan tohumlarından izole edilen olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus oranı ve kallus ağırlığı ile embriyojenik kalus oranı (2000 yılı)

Ortam	2,4 D mg/l	Uygulama	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg)	Embriyojenik kallus oranı (%)
MS	0.5	Aydınlık	83.3 ± 9.6	32.0 ± 11.1	100
		Karanlık	100 ± 0	50.1 ± 5.8	100
	1.0	Aydınlık	83.3 ± 9.6	49.3 ± 5.7	100
		Karanlık	72.2 ± 4.2	34.9 ± 8.1	100
	2.0	Aydınlık	94.4 ± 5.5	14.3 ± 3.3	100
		Karanlık	94.4 ± 5.5	78.7 ± 13.6	100
	4.0	Aydınlık	70.9 ± 3.5	12.4 ± 1.2	100
		Karanlık	91.7 ± 9.2	48.4 ± 12.1	100
NN	0.5	Aydınlık	77.8 ± 4.5	16.1 ± 0.3	100
		Karanlık	90.8 ± 4.5	43.1 ± 8.6	100
	1.0	Aydınlık	77.8 ± 18.0	23.1 ± 12.0	100
		Karanlık	100 ± 0	29.0 ± 7.3	100
	2.0	Aydınlık	66.7 ± 13.3	27.8 ± 11.1	100
		Karanlık	100 ± 0	20.5 ± 0	100
	4.0	Aydınlık	54.2 ± 10.8	10.9 ± 6.5	100
		Karanlık	100 ± 0	48.5 ± 16.8	100
B5	0.5	Aydınlık	100 ± 0	38.1 ± 10.8	100
		Karanlık	100 ± 0	47.1 ± 5.4	100
	1.0	Aydınlık	83.4 ± 17.7	82.5 ± 35.0	100
		Karanlık	100 ± 0	35.4 ± 1.0	100
	2.0	Aydınlık	83.4 ± 17.7	16.4 ± 8.1	100
		Karanlık	100 ± 0	79.2 ± 0	100
	4.0	Aydınlık	83.4 ± 14.4	16.9 ± 2.9	100
		Karanlık	100 ± 0	80.8 ± 34.3	100

4.1.6.2. Yalova İncisi**4.1.6.2.(1). Embriyojenik Kallus Uyartımı**

Yalova İncisinin olgun zigotik embriyo eksplantlarından kallus oluşturanların oranı **Çizelge 4.48'** de verilmiştir.

MS'in 1 ve 4 mg/l 2,4-D eklenen ortamların karanlık kültürlerinde eksplantlarda kallus oluşmamıştır. Karanlıkta kültüre alınan MS + 0.5 mg/l 2,4-D de %25, MS + 2 mg/l 2,4-D'de ise %6.7 oranında eksplantlar kallus oluşturmıştır. 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının aydınlığında bulunan eksplantların %13.3'ünde kallus meydana gelirken 2 mg/l 2,4-D de bu oran artarak %20.8'e ulaşmış sonra tekrar 4 mg/l 2,4-D de %4.2 oranına kadar düşmüştür. NN ortamının aydınlıklarından iyi sonuç alınamamıştır. Yalnızca 1 ve 2 mg/l 2,4-D içerenlerden sırasıyla %4.2 ve %3.3 gibi çok düşük oranda kallus elde edilebilmiştir. NN'in karanlığında 0.5 mg/l 2,4-D (%3.3) den, 2 mg/l 2,4-D (%26.6) ye doğru bir artış, 2 mg/l 2,4-D'den de 4 mg/l 2,4-D (%20) ye doğru bir azalma olduğu gözlenmiştir. B5'e eklenen 1 mg/l 2,4-D'nin karanlığında %23.3, 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlığında %20.7 oranında eksplant kallus oluşturmuş, diğer konsantrasyon ve koşullarda kallus oluşum oranları %10'dan daha az olarak bulunmuştur. Oluşan kallusların tamamının embriyojenik olduğu belirlenmiştir

4.1.6.2.(2). Embriyo Uyartımı

Farklı ortam, 2,4-D ve yetiştirme koşullarında kültüre alınan olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarından elde edilen kalluslar yine aynı 2,4-D konsantrasyonları bulunan ortamlarda üç ayda bir alt kültüre alındığında veya aynı ortamın hormonsuzuna yerleştirilip ayda bir alt kültüre alındığında bu kalluslardan herhangi bir somatik embriyo oluşumunun meydana gelmediği görülmüştür.

Çizelge 4.48. Yalova İncisinin olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantlarında değişik ortam ve koşullarda elde edilen kallus, ve embriyojenik kallus oluşturma oranları

Ortam	2,4 D mg/l	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksplantların oranı (%)	Embriyojenik kallus oranı (%)
MS	0.5	Aydınlık	13.3 ± 5.9	100
		Karanlık	25.0 ± 15.0	100
	1.0	Aydınlık	13.3 ± 3.6	100
		Karanlık	0	0
	2.0	Aydınlık	20.8 ± 8.3	100
		Karanlık	6.7 ± 4.2	100
	4.0	Aydınlık	4.2 ± 4.2	100
		Karanlık	0	0
NN	0.5	Aydınlık	0	0
		Karanlık	3.3 ± 3.3	100
	1.0	Aydınlık	4.2 ± 4.2	100
		Karanlık	16.7 ± 0	100
	2.0	Aydınlık	3.3 ± 3.3	100
		Karanlık	26.6 ± 7.1	100
	4.0	Aydınlık	0	0
		Karanlık	20.0 ± 9.8	100
B5	0.5	Aydınlık	20.7 ± 12.0	100
		Karanlık	8.3 ± 5.8	100
	1.0	Aydınlık	8.4 ± 3.8	100
		Karanlık	23.3 ± 10.4	100
	2.0	Aydınlık	8.4 ± 4.6	100
		Karanlık	3.3 ± 3.3	100
	4.0	Aydınlık	10.0 ± 6.7	100
		Karanlık	8.4 ± 4.6	100

4.1.7. Elde Edilen Bitkiciklerin Dış Koşullara Aktırılması İle İlgili Bulgular

Çizelge 4.49'dan da görülebileceği gibi oda sıcaklığında yarı gölge bir ortamda dış koşullara alıştırılmaya çalışılan 92 somatik bitkiden 58'i canlı kalmış ve yaşama oranı %63 olmuştur. Büyütme odasında kontrollü koşullarda tutulan 99 somatik bitkicikten 91'i canlılığına devam etmiş ve yaşama oranı %91.9 olmuştur (Şekil 4.11).

Çizelge 4.49. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriolarından elde edilen somatik embrioların, çimlendirilmesiyle meydana gelen bitkiciklerin dış koşullara aktarılmasından 30 gün sonra alınan sonuçlar

Kültür koşulları	Toprağa aktarılan bitki sayısı (n)	Yaşayan bitki sayısı (n)	Yaşama oranı (%)
A	92	58	63
B	99	91	91.9

A: Oda sıcaklığı, yarı gölge ortam

B: Fotoperiyodu 16/8 saat, sıcaklığı 25 °C, ışıklandırması 3000-4000 lüks olan iklim odası

4.1.8. Elde Edilen Bitkiciklerde Kromozom Sayımı İle İlgili Bulgular

41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından oluşan somatik embrioların çimlendirilmesiyle elde edilen bitkiciklerin 24'ünden kök ucu örnekleri alınmıştır. Bu örnekleme 5 kez tekrarlanmıştır. Ancak kök uçlarında her defasında boyanma çok düşük düzeyde olmuştur. Bu kök uçlarında yapılan incelemeler sonucunda asma kromozomlarının çok küçük olduğu görülmüş ve sayım güçlüğüle yapılabilmektedir. Kromozom sayımları sonunda somatik bitkilerin $2n = 38$ kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.12). Görsel incelemeler sonucunda da somatik bitkiler ile sürgün ucu kültüründen elde edilen bitkiler arasında morfolojik farklılıkların olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.11. Dış koşullara alıştırılmış somatik bitkilerin farklı gelişme dönemlerindeki görünümleri



Şekil 4.12. 41 B'nin somatik bitkilerinde kromozomların görünümü



Şekil 4.13. 41 B anacına ait somatik embriyonun çimlenmesiyle elde edilen somatik bitkicik ve sürgün ucu kültürü ile elde edilen bitkiciğin genel görünümü

4.2. Organogenesis Bulguları

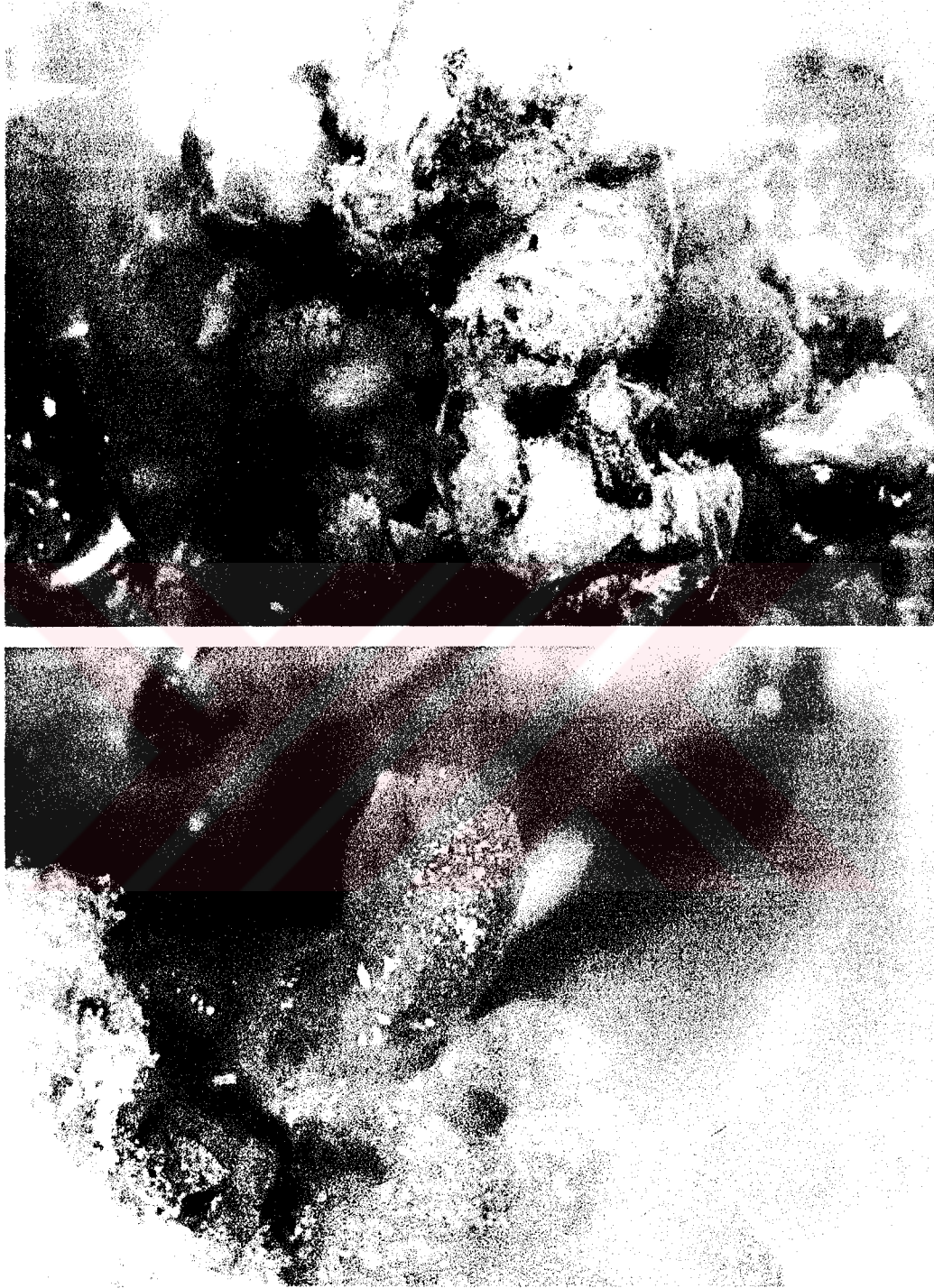
4.2.1. Yaprak Ayası Eksplantından Elde Edilen Bulgular

4.2.1.1. 41 B

Çizelge 4.50'den de görülebileceği gibi kallus oluşturan eksplantların oranı aydınlık ve karanlık uygulamalara, ortamlara ve BA konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiştir. 2 mg/l BA bulunan B5 ortamındaki aydınlık kültürlerde %100, karanlık kültürlerde de %95 gibi yüksek oranlarda kallus oluşumu saptanmıştır. 1 mg/l BA içeren MS ortamının aydınlık ve karanlık kültürlerinde kallus oluşmamıştır.

Denemede kullanılan ortam ve BA konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık koşulları birlikte değerlendirildiğinde aydınlık koşullarda kültüre alınan eksplantların karanlıktakilerden daha yüksek oranda canlılıklarını kaybettikleri belirlenmiştir. Canlılık kaybı, aydınlıktakilerde %0 ile %51.8, karanlıktakilerde ise %0 ile %19.0 arasında değişen oranlarda olmuştur (Çizelge 4.50).

Adventif göz oluşumu, MS ve B5 ortamlarına eklenen 2 mg/l BA' da, 1 mg/l BA'dan daha başarılı bulunmuştur (Şekil 4.14). NN'de ise farklılık saptanmamıştır. Aydınlık koşullarda 2 mg/l BA bulunan B5 ortamında %70, NN ortamında %41.7, MS ortamında %20.5 oranında adventif göz oluşumu tespit edilmiştir. Karanlık koşullarda ise 2 mg/l BA bulunan NN ortamında %40, B5 ortamında %30 ve MS ortamında %9.5 oranında oluşum belirlenmiştir. 1 mg/l BA bulunan ortamlar içerisinde en iyi sonucu NN ortamının aydınlık (%40.7) ve karanlık (%43.3) koşulları vermiştir. 2 mg/l BA'lı B5 ortamının karanlık kültürlerinden ortalama 2.8 adet, aydınlığından 2.5 adet adventif göz elde edilmiştir. Bu konsantrasyonlarda NN ortamının aydınlığından ortalama 2.6 adet, karanlığından 1.9 adet, MS ortamının aydınlık ve karanlığından ortalama 2 şer adet adventif göz oluştuğu belirlenmiştir. 1 mg/l BA bulunan MS ortamının aydınlıktaki kültürlerinde ortalama 2 adet göz bulundururken karanlıktakilerden adventif göz elde edilememiştir. 1 mg/l BA bulunan NN ve B5 ortamının karanlığından aydınlığa göre daha yüksek değerler alınmıştır (Çizelge 4. 50).



Şekil 4.14. 41 B anacının yaprak ayası eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü

Çizelge 4.50. 41 B anacının yaprak ayası eksplantlarında adventif göz oluşumu

Ortam	BA (mg/l)	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksp oranı (%)	Canlılığını kaybeden eksp. oranı (%)	Adv. göz oluşturan eksp. oranı (%)	Ort. adv. göz sayısı (adet/eksplant)
MS	1	Aydınlık	0	20.0 ± 7.6	10.0 ± 5.1	2.0 ± 0
		Karanlık	0	3.7 ± 3.7	0	0
	2	Aydınlık	65.9 ± 9.9	22.7 ± 8.9	20.5 ± 8.0	2.0 ± 0.5
		Karanlık	61.9 ± 16.4	19.0 ± 14.4	9.5 ± 6.1	2.0 ± 1.0
NN	1	Aydınlık	48.1 ± 12.8	51.8 ± 13.8	40.7 ± 6.8	1.8 ± 0.2
		Karanlık	33.3 ± 6.3	0	43.3 ± 9.6	2.3 ± 0.2
	2	Aydınlık	52.8 ± 14.1	22.2 ± 12.6	41.7 ± 8.8	2.6 ± 0.6
		Karanlık	75.7 ± 6.8	8.3 ± 5.4	40.0 ± 16.1	1.9 ± 0.2
B5	1	Aydınlık	80.0 ± 10.1	6.7 ± 4.4	0	0
		Karanlık	19.2 ± 11.5	3.3 ± 3.3	6.7 ± 4.4	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	100	0	70.0 ± 8.9	2.5 ± 0.3
		Karanlık	95.0 ± 4.2	0	30.0 ± 18.8	2.8 ± 0.5

4.2.1.2. Yalova İncisi

Yalova İncisi yaprak eksplantlarında, yalnızca 2 mg/l BA içeren NN ortamının karanlıktaki kültürlerinde ve 1 mg/l BA içeren B5 ortamının aydınlıklarında kallus oluşumu (sırasıyla %7.1 ve %3.0) görülmüştür (Çizelge 4.51).

2 mg/l BA içeren MS ortamındaki eksplantların tamamı (%100), NN + 1 mg/l BA + aydınlıkta %93.3'ü, MS + 1 mg/l BA + aydınlıkta %88.6'sı, kararak canlılıklarını kaybetmişlerdir. 2 mg/l BA bulunan B5 ortamının karanlık kültürlerindeki yapraklarda herhangi bir kararma ve ölüm meydana gelmemiştir (Çizelge 4.51).

Adventif göz oluşturan eksplantların oranı (Şekil 4.15) 2 mg/l BA içeren NN ve B5 ortamlarında yüksek bulunmuştur. 2 mg/l BA bulunduran B5 ve NN'nin

aydınlık koşullarında sırasıyla %25 ve %20, karanlık koşullarında %10 ve %12.5 oranında eksplant adventif göz oluşturabilmiştir. 2 mg/l BA içeren MS ortamındaki eksplantlarda adventif göz oluşumu meydana gelmemiştir. 1 mg/l BA içeren MS'in karanlığında ve NN'in aydınlığında adventif göz oluşumu sırasıyla %5.6 ve %6.7 oranlarında saptanmıştır. Bunun dışındaki uygulamalarda bulunan eksplantlarda adventif göz belirlenmemiştir (Çizelge 4.51).

Ortalama adventif göz sayısı incelendiğinde NN ve B5'in 2 mg/l BA bulunduran ortamlarının aydınlık kültürlerinden sırasıyla 1.0 ve 1.5 adet; karanlıktakilerden ise 1.7 ve 1.0 adet adventif göz elde edilmiştir. 1 mg/l BA içeren MS'in karanlığında ve NN'in aydınlığında ortalama 1.0' er adet adventif göz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.51).

Çizelge 4. 51. Yalova İncisi yaprak ayası eksplantlarında adventif göz oluşumu

Ortam	BA (mg/l)	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksp. oranı (%)	Canlılığını kaybeden eksp. oranı (%)	Adv. göz oluşturan eksp. oranı (%)	Ort. adv. göz sayısı (adet/eksplant)
MS	1	Aydınlık	0	88.6 ± 8.0	0	0
		Karanlık	0	20.0 ± 9.3	5.6 ± 3.7	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	0	100	0	0
		Karanlık	0	100	0	0
NN	1	Aydınlık	0	93.3 ± 5.9	6.7 ± 6.6	1.0 ± 0
		Karanlık	0	4.2 ± 4.2	0	0
	2	Aydınlık	0	10.0 ± 7.0	20.0 ± 11.4	1.0 ± 1.0
		Karanlık	7.1 ± 4.6	3.1 ± 3.1	12.5 ± 6.6	1.7 ± 0.3
B5	1	Aydınlık	3.0 ± 3.0	21.2 ± 7.0	0	0
		Karanlık	0	3.7 ± 3.7	0	0
	2	Aydınlık	0	8.3 ± 8.1	25.0 ± 14.4	1.5 ± 0.5
		Karanlık	0	0	10.0 ± 9.8	1.0 ± 0



Şekil 4.15. Yalova İncisi'nin yaprak ayası eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü

4.2.2. Yaprak Sapı Eksplantından Elde Edilen Bulgular

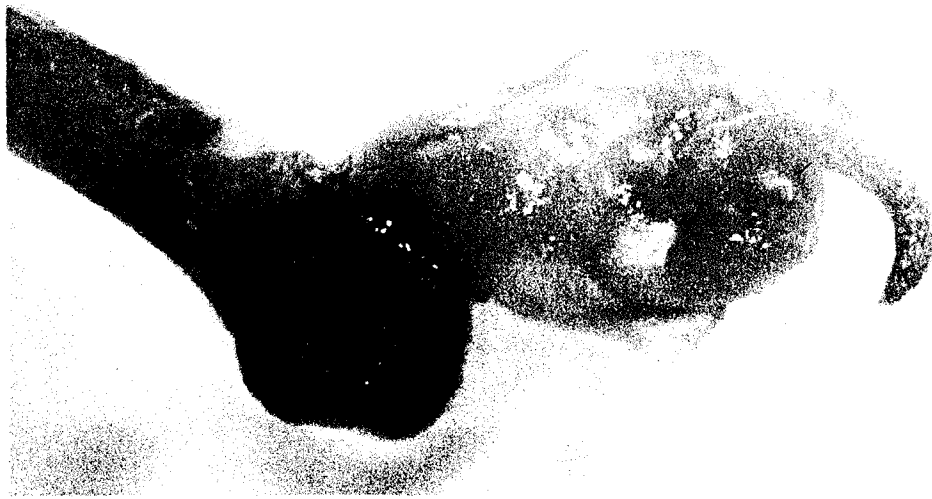
4.2.2.1. 41 B

Çizelge 4.52'den de görülebileceği gibi 2 mg/l BA eklenen MS ve NN ortamlarının aydınlık ve karanlık kültürlerindeki eksplantlar kallus oluşturmazken B5 ortamında, karanlıktaki kültürler %81.3 ve aydınlıktaki kültürler %65.6 oranında kallus oluşturmuşlardır.

2 mg/l BA eklenen MS ortamının karanlıktaki kültürlerinde eksplantların %100'ü, aydınlıktakilerin %91.7'si; 2 mg/l BA içeren NN ortamının aydınlık kültürlerinde ise eksplantların %84.4'ü canlılığını kaybetmiştir. Diğer uygulamalarda canlılık kaybı değerleri %18.2 den daha düşük olarak saptanmıştır.

Adventif göz oluşturan eksplantların oranı %32.1 ile 2 mg/l BA içeren NN ortamının karanlık kültürlerinde en yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bunu %13.3 ile 1 mg/l BA bulunan NN ortamının aydınlıktaki eksplantları ve %10 ile 1 mg/l BA bulunduran B5 ortamının karanlık kültürleri izlemiştir.

Adventif göz oluşturan ortamlar, BA konsantrasyonu ve büyütme koşulları incelendiğinde tüm uygulamalarda ortalama 1'er adet adventif göz oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.16. 41B'nin yaprak sapı eksplantında adventif göz oluşumunun görünümü

Çizelge 4.52. 41 B anacının yaprak sapı eksplantlarında adventif göz oluşumu

Ortam	BA (mg/l)	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksp oranı (%)	Canlılığını kaybeden eksp. oranı (%)	Adv. göz oluşturan eksp. oranı (%)	Ort. adv. göz sayısı (adet/eksplant)
MS	1	Aydınlık	16.7 ± 7.4	6.7 ± 4.4	0	0
		Karanlık	27.3 ± 10.7	0	3.0 ± 3.0	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	0	91.7 ± 3.1	0	0
		Karanlık	0	100 ± 0	0	0
NN	1	Aydınlık	33.3 ± 9.5	0	13.3 ± 5.5	1.0 ± 0
		Karanlık	12.2 ± 9.1	18.2 ± 7.1	0	0
	2	Aydınlık	0	84.4 ± 6.0	0	0
		Karanlık	0	3.1 ± 3.1	32.1 ± 10.9	1.0 ± 0
B5	1	Aydınlık	33.3 ± 12.6	0	0	0
		Karanlık	30.0 ± 12.3	0	10.0 ± 5.1	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	65.6 ± 7.0	2.5 ± 2.5	2.5 ± 2.5	1.0 ± 0
		Karanlık	81.3 ± 12.2	0	0	0

4.2.2.2. Yalova İncisi

Yalova İncisi yaprak sapı eksplantlarından elde edilen bulgular Çizelge 4.53'de sunulmuştur.

Bu eksplantlarda kallus oluşumu, yalnızca NN ve B5 ortamlarına eklenen 1 ve 2 mg/l BA'nın karanlık kültürlerinde görülmüştür. 1 ve 2 mg/l BA içeren NN ortamında sırasıyla %11.9 ve %3.1; B5 ortamında da aynı sırayla %26.7 ve %20.8 oranında eksplantta kallus oluşmuştur.

2 mg/l BA bulunan MS ortamındaki eksplantların tamamı (%100) aydınlık ve karanlık koşulların her ikisinde canlılıklarını kaybetmiştir. Buna karşın 2 mg/l BA bulunan NN'in karanlık kültürlerindeki eksplantlarda ve 1 mg/l BA bulunan B5 ortamının aydınlık ve karanlık koşullarındaki eksplantlarda herhangi bir canlılık kaybı görülmemiştir

Adventif göz oluşturan eksplantlar incelendiğinde bunların 1 mg/l BA içeren MS ortamının aydınlık ve karanlığında sırasıyla %10.7 ve %10, 2 mg/l BA içeren NN ortamının karanlığında %3.1, 1 mg/l BA içeren B5 ortamının karanlığında ise %3.3 oranında oldukları görülmektedir. Adventif göz oluşturan tüm uygulamalarda ortalama 1'er adet göz saptanmıştır.

Çizelge 4.53. Yalova İncisi yaprak sapı eksplantlarında adventif göz oluşumu

Ortam	BA (mg/l)	Kültür koşulları	Kallus oluşturan eksp. oranı (%)	Canlılığını kaybeden eksp. oranı (%)	Adv. göz oluşturan eksp. oranı (%)	Ort. adv. göz sayısı (adet/eksplant)
MS	1	Aydınlık	0	20.0 ± 9.5	10.7 ± 7.3	1.0 ± 0
		Karanlık	0	12.9 ± 4.1	10.0 ± 5.4	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	0	100 ± 0	0	0
		Karanlık	0	100 ± 0	0	0
NN	1	Aydınlık	0	18.5 ± 11.1	0	0
		Karanlık	11.9 ± 8.1	4.8 ± 4.7	0	0
	2	Aydınlık	0	10.4 ± 7.0	0	0
		Karanlık	3.1 ± 3.1	0	3.1 ± 3.1	1.0 ± 0
B5	1	Aydınlık	0	0	0	0
		Karanlık	26.7 ± 9.3	0	3.3 ± 3.3	1.0 ± 0
	2	Aydınlık	0	87.5 ± 8.8	0	0
		Karanlık	20.8 ± 16.1	3.1 ± 3.1	0	0

5. TARTIŞMA

5.1. Somatik Embriyogenesis

Asmada somatik embriyogenesis ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, anter (Hirabayashi ve ark., 1976; Rajasekaran ve Mullins, 1979 ve 1983; Mauro ve ark., 1986; Gray ve Mortensen, 1987; Stamp ve Meredith, 1988 b; Cersosimo ve ark., 1990; Langenbucher ve Alleweldt, 1993; Mozsar ve Süle, 1994; Bensaad ve ark., 1996; Salunkhe ve ark., 1999), döllenmemiş ovül (Mullins ve Srinivasan, 1976), yumurtalık (Gray ve Mortensen, 1987), olgun zigotik embriyo (Stamp ve Meredith, 1988 a), olgunlaşmamış zigotik embriyo (Emershad ve Ramming, 1994), olgunlaşmamış yaprak ve sürgün parçaları (Krul ve Worley, 1977), olgun yaprak (Stamp ve Meredith, 1988 b), yaprak sapı (Martinelli ve ark., 1991 ve 1993; Robacker, 1993) ve sülük (Salunkhe ve ark., 1997) gibi farklı eksplantların somatik embriyo elde edilmesi amacıyla kullanıldığı ve başarılı sonuçların elde edildiği gözlenmiştir.

Bu tezde somatik embriyo elde etmek amacıyla eksplant olarak anter, yaprak ve yaprak sapı (*in vivo* ve *in vitro*), sülük, olgunlaşmamış ve olgun zigotik embriyolar kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan iki genotipten biri olan 41 B Amerikan Asma Anacı anterleri 2,4-D'nin yalnız başına kullanıldığı ortamlarda kallus oluşturmaz iken 2,4-D ve BA'nın birlikte kullanıldığı ortamlarda kallus oluşturmışlardır. Kallus oluşumu daha çok, ortamların karanlık kültürlerinde gözlenmiştir. Çizelge 4.1 ve 4.2'de de görülebileceği gibi 41 B anterleri için en uygun ortamın karanlık koşullarda kültüre alınan ve sırasıyla 1 mg /l 2,4-D + 0.2 mg /l BA, 2 mg /l 2,4-D + 1 mg /l BA ve 4 mg /l 2,4-D + 2 mg /l BA kombinasyonlarının eklendiği B5 ortamının olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kallusların tamamı embriyojenik kapasiteye sahip olmasına rağmen bu kalluslardan hormonsuz ortamda somatik embriyo uyartımı sağlanamamıştır. Ancak 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA içeren NN ortamında çok az da olsa embriyo uyartımı olmuştur. Bu durum 41 B kalluslarından embriyo uyartımı için ortama mutlaka büyümeyi düzenleyici maddelerin eklenmesi gerektiğini göstermiştir. Matsuta ve Hirabayashi (1989) ise besin ortamına 2,4-D yerine NAA

ve IAA eklendiğinde *V. vinifera* hücre hatlarında somatik embriyo uyartımı olmadığını, 2,4-D ve BAP'ın her ikisinin veya birinin ortamda olmaması durumunda *V. vinifera* hücre hatlarından somatik embriyo uyartımı olumsuz etkilendiğini bildirmektedirler. Oysa **Salunkhe ve ark. (1999)** çalışmalarında 2,4-D yerine 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA içeren NN ortamında somatik embriyo oluşumunu sağlamışlar ancak, 1.8 mg/l IAA ve 2 mg/l BAP eklenen NN ortamında anter kalluslarından somatik embriyo oluşturmamışlardır. Bu durum muhtemelen 2,4-D içeren ortamda kallus oluşturulduğu için 2,4-D'ye maruz kalma daha sonraki alt kültürlerde embriyojenik potansiyeli başlatmış olabilir. Araştırmacıların elde ettikleri somatik embriyoların %69.5'i gelişmemiş, %16.8'i yalnızca kök oluşturmuş ve %13.7'si bitkiciğe dönüşmüştür. Ancak bunun tersine embriyo uyartımı için hormonsuz ortamın yeterli olduğunu savunan bazı araştırmacılar da (**Robacker 1993; Salunkhe ve ark., 1997**) bulunmaktadır.

Bu tezde, Yalova İncisi üzüm çeşidi anterlerinden üç değişik ortam, farklı 2,4-D ve BA kombinasyonlarında ve iki ayrı kültür koşulunda kallus elde edilememiştir. Bu durum anter eksplantından kallus ve bunlardan da somatik embriyo oluşumu üzerine genotipin çok etkili olduğunu göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda da somatik embriyo oluşumunda genotipin çok etkili bir faktör olduğu pek çok değişik araştırmacı tarafından da (**Rajasekaran ve Mullins, 1983; Stamp ve Meredith, 1988; Clog ve ark., 1990; Mozsar ve Viczian, 1996**) belirtilmektedir.

Rejenerasyon çalışmalarında kullanılacak genotiplerin yapısı ve bunların çiçeklerinden alınan eksplantlar, kültürlerin başarısını önemli düzeyde etkilemektedir (**Gray ve Mortensen 1987**). Bazı araştırmacılar anterlerden başarıyla somatik embriyo elde edebilirken (**Mauro ve ark. 1986; Gray ve Mortensen 1987; Stamp ve Meredith 1988 b, Perl ve ark. 1995, Bensaad ve ark., 1996**); bazı araştırmacılar ise yalnızca erkek çiçekli asmaların anterlerinin embriyogenesise daha fazla eğilimli olduğunu (**Rajasekaran ve Mullins 1983**), bazıları ise hermafrodit bitkilerin yalnızca ovülden somatik embriyo ile üretildiğini açıklamışlardır (**Mullins ve Srinivasan 1976**).

Nakano ve ark. 1997 ise yumurtalık eksplantından anter ve yaprağa göre daha yüksek oranda embriyo elde etmiştir. **Martinelli ve ark. (2001)** da Chardonnay ve

Brachetto g.l. çeşitlerinin yumurtalık eksplantlarından (%14), anter eksplantlarına göre daha yüksek oranda (sırasıyla %2 ve %17) somatik embriyo elde etmiştir.

Bu tezde, *in vitro* da yetiştirilen 41 B bitkiciklerinden alınan yaprak eksplantları, *in vivo* da yetiştirilen bitkilerden alınanlara göre denemede kullanılan farklı ortam, 2,4-D ve kültür koşullarında belirgin bir şekilde daha yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. *In vivo* koşullardan alınan yaprak eksplantlarında en düşük kallus oranı % 0 iken, *in vitro*'da ise bu oran %66.7 olmuştur. Embriyojenik kallus oranı *in vitro* eksplantlarda 4 uygulama hariç bunun dışındaki uygulamalarda %100 olarak bulunmuş, *in vivo* eksplantlarda bu oran uygulamalara göre oldukça değişkenlik göstererek %0 ile %100 arasında değişmiştir. Çalışmamızda genelde *in vivo*'da 3 ve 4 dereceli, *in vitro* da ise 3 ve 5 dereceli kallusların oluştuğu saptanmıştır.

Yalova İncisi üzüm çeşidinde de *in vitro* koşullardan alınan yaprak eksplantları *in vivo* koşullardan alınanlara göre daha iyi sonuç vermiştir. *In vivo* koşullardan alınan yapraklar %8.4 ile %100 arasında, *in vitro* da ise %62.5 ile %100 arasında değişen oranlarda kallus oluşturmuştur. Embriyojenik kallus oluşumu *in vivo* 'da %50 ile %100, *in vitro*'da %60 ile %100 arasında değişen oranlarda gerçekleşmiştir. *In vivo* eksplantlar *in vitro* eksplantlardan daha yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. Bunun nedeninin muhtemelen *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan yaprak eksplantlarının yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması ve doku zararlanmasına uğramasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Clog ve ark. (1990) da bu düşüncüyü desteklemektedirler.

Bu denemede yaprak eksplantları yalnızca 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları eklenmiş besin ortamlarında kültüre alındığında eksplantlardan değişik oranda embriyojenik kallus elde edilmiştir. Torregrossa ve ark. (1995) çalışmalarında besin ortamına yalnızca 2.2 mg/l 2,4-D eklendiğinde *Eu vitis x Muscadinia* hibritlerinin yaprak kültürlerinde embriyojenik olmayan kallus oluşumu gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Bir başka araştırmacı ise 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BA ilave edilen ortamda *Muscadinia* üzümlerinin yaprak eksplantlarından embriyojenik kallus elde etmiştir (Robacker 1993). Martinelli ve ark. (1991) da yaprak ayası eksplantından somatik embriyogenesi teşvik etmek için ortama eklenen en uygun BAP/2,4-D

konsantrasyonunun 1/0.1 mg/l olduğunu belirtmiştir. Yaprak ayalarında meydana gelen beyaz embriyojenik kalluslardan 7 ay sonra %3 oranında globular embriyolar görülmüştür. **Stamp ve Meredith (1988 b)** çalışmalarında embriyogenesiste genotip/eksplant kombinasyonunun diğer faktörlerden daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. St. George çeşidinde en yüksek somatik embriyo oluşum oranı yaprak ayası eksplantlarında %25, anter eksplantından ise %80 olarak gerçekleşmiştir. **Tang ve Mullins (1990)** dikkatli seçilmiş yaprak ayası eksplantlarındaki rejeneratif yeterliliğin çok değişken olmasının nedeninin bilinmediğini bildirmişlerdir.

Bu tezde, 41 B anacının *in vitro* yaprak sapı eksplantları *in vivo* 'dakilerden daha yüksek oranda kallus oluşumu gerçekleştirmiş ve embriyojenik kallus oranı da bu eksplantta yüksek bulunmuştur. *In vitro* yaprak sapı eksplantları denemede kullanılan tüm uygulamalarda %100 oranında kallus oluşturmuştur. *In vivo* da ki yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumu uygulamalara göre %26.7 ile %100 arasında değişmiştir. Embriyojenik kallus oranları *in vitro* eksplantlarda minimum %53.3, *in vivo* da ise minimum %0 oranında meydana gelmiştir. Kallus ağırlığı bakımından *in vivo* eksplantlar *in vitro* 'dakilerden daha yüksek değerler vermiştir. *In vivo* 'da kallus ağırlıkları özellikle B5 ortamında 1 ve 2 mg/l 2,4-D bulunan aydınlık kültürlerde oldukça yüksek (sırasıyla, 1434.3 ve 1319.1 mg) çıkmıştır. *In vitro* yaprak sapı eksplantlarında da en yüksek kallus ağırlıkları B5 ortamından özellikle de 2.0 mg/l 2,4-D bulunan aydınlık kültürlerde (269.6 mg) bulunmuştur.

Yalova İncisi üzüm çeşidinin *in vitro* yaprak sapı eksplantları *in vivo* yaprak sapı eksplantlarından daha yüksek oranlarda kallus oluşumu ve embriyojenik kallus oranı vermiştir. *In vitro* yaprak sapı eksplantlarında 4 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının aydınlık kültürü (%36.7) dışındaki uygulamalarda %67.5'in üzerinde eksplantlar kallus oluşturmuşlardır. *In vivo* 'da ise kallus oluşumu %8.4 ile %100 arasında değişen oranlarda meydana gelmiştir. *In vitro* yaprak sapı eksplantlarında embriyojenik kallus oranı %75 - %100, *in vivo* 'da ise %54.2 -%100 arasında değişmiştir. Diğer özelliklerden farklı olarak kallus ağırlığı *in vivo* eksplantlarda *in vitro* eksplantlara göre daha yüksek çıkmıştır. Kallus ağırlığı *in vivo* 'da en fazla 352.4 mg olarak ve 1 mg/l 2,4-D eklenen B5 ortamının aydınlık uygulamalarından,

in vitro'da 83.4 mg olarak B5 ortamına eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlık uygulamalarından elde edilmiştir.

Çalışmada yaprak sapları yalnızca 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren üç ortamda ve farklı kültür koşullarında değişik oranlarda kallus oluşturmuş ve oluşan kallusların değişik oranda embriyojenik kapasiteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu kalluslar hormon içermeyen ortamlarda alt kültüre alındığında herhangi bir somatik embriyo oluşumu görülmemiştir.

Martinelli ve ark. (1991), yaprak saplarından somatik embriyogenesisi teşvik etmek için besin ortamına BAP ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını eklemiştir. Ortama eklenen en uygun BAP/2,4-D konsantrasyonunun 1 mg/l /1 mg/l olduğunu belirtmiştir. Yaprak saplarından elde edilen beyaz renkli embriyojenik kalluslardan, 7 ay sonra %4 oranında globular embriyolar elde edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 41 B'nin sülük eksplantlarında, denemede kullanılan tüm uygulamalarda kallus oluşturan eksplant oranı %55.6 ve üzerinde bulunmuş, Yalova İncisi'nde ise bu oran 4 mg/l 2,4-D'nin karanlık (%58.3) uygulaması dışında %70.8 ve üzerinde gerçekleşmiştir. Kallus ağırlığı bakımından en yüksek değerleri 41 B'nin sülük eksplantında B5 ortamının aydınlık uygulamaları; Yalova İncisi'nde ise B5 ortamına eklenen 0.5 ve 1 mg/l 2,4-D'nin aydınlık ve karanlık uygulamaları vermiştir. Embriyojenik kallus oluşumu Yalova İncisinde MS ortamına eklenen 0.5 mg/l 2,4-D'nin aydınlık uygulaması dışındaki uygulamalarında %100 oranında gerçekleşmiştir. NN ve B5 ortamlarında ise embriyojenik kallus oranı %12.5 ile %100 arasında değişmiştir. 41 B'de %100 oranında oluşum ancak 2 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının karanlık kültürlerinde meydana gelmiştir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında sülüğün eksplant olarak kullanıldığı yalnız bir çalışmaya ulaşılmıştır. Bu tez sülüğün eksplant olarak kullanıldığı çok az çalışmadan birisi olma özelliği taşımaktadır.

Salunkhe ve ark. (1997) çalışmalarında embriyojenik kallus uyartımı için besin ortamına BA, NAA ve GA₃ eklemişler ve Thompson'da %13.3, Tas-e-Ganesh ve Sonaka'da %34.8 oranında embriyojenik kallus elde etmişlerdir. Embriyo uyartımı için ise ortama yalnızca BA eklemişlerdir. Embriyolardan bitkicik elde etme oranı ise Tas-e Ganesh'de %1.9, Sonaka'da %4.3 ve Thompson'da %8.5 olarak

bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise embriyojenik kallus uyartımı için 2,4-D; embriyo uyartımı için de hormonsuz ortam kullanılmış, sonuçta embriyo elde edilememiştir.

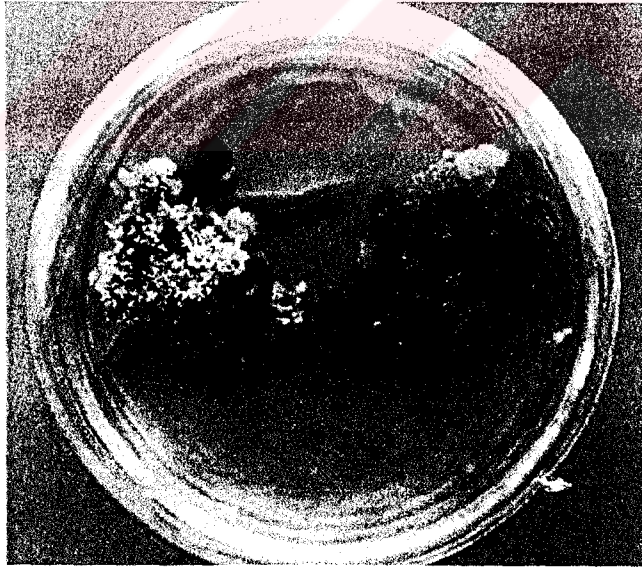
Bu çalışmada, yaprak ayası, yaprak sapı ve sülük gibi eksplantlardan, yalnızca 2,4-D bulunan ortamlarda değişik oranlarda embriyojenik kallus elde edilmiş ancak, daha sonra bu kalluslardan embriyo uyartımı sağlanamamıştır. Bunun muhtemelen ortamda bir sitokinin eksikliğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Diğer çalışmalarda ortamda BA' nın bulunması nedeniyle somatik embriyo oluşumunun meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu tezde, 41 B'nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarının %90.0' dan fazlası kallus oluşturmuş ve kallus ağırlıkları en yüksek miktarda (2101.3 mg) B5 + 0.5 mg/l 2,4-D + karanlık uygulamasından meydana gelmiştir. Elde edilen kallusların ortalama 3 dereceli olduğu bulunmuştur. Tüm uygulamalardan elde edilen kallusların tamamının embriyojenik kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu embriyojenik kalluslar yine aynı ortam ve 2,4-D konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık uygulamalarında iki kez ayda bir ve iki kez de üç ayda bir alt kültüre alındığında B5 ortamına eklenen 4.0 mg/l 2,4-D'nin aydınlık uygulamaları dışında denemede kullanılan tüm uygulamalarda değişik oranlarda embriyo uyartımının olduğu görülmüştür. Genelde karanlık uygulamalarda aydınlığa göre daha yüksek oranda embriyo oluşumu saptanmıştır. En iyi sonuçlar B5 ortamından alınmış bunu sırasıyla NN ve MS ortamları izlemiştir. Somatik embriyo oluşumunda globular, kalp ve torpedo devresindeki embriyolar belirlenip bunların sayımı yapılmıştır. Torpedo devresine gelmiş en yüksek sayıda embriyo oluşumu B5 + 1 mg/l 2,4-D'nin karanlık uygulamalarında 559 adet olarak meydana gelmiştir.

Yalova İncisinin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantında en düşük kallus oluşumu ortamlara eklenen 4 mg/l 2,4-D'nin aydınlık ve karanlık uygulamalarından elde edilmiştir. 4 mg/l 2,4-D uygulaması dışındaki uygulamalarda %71.5'in üzerinde kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Kallus ağırlığı, B5 ortamında diğer ortamlara göre daha yüksek olmuştur. Ortalama kallus derecesi 2 olarak saptanmıştır. Denemede kullanılan uygulamalarda oluşan kallusların tamamının embriyojenik olmasına rağmen, yalnızca 1 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamının aydınlık ve 0.5 mg/l 2,4-D

bulunan NN ortamının aydınlık ve karanlık uygulamalarında iki kez, ayda bir ve iki kez, üç ayda bir alt kültüre alma işlemi yapıldığında embriyo oluşumu sağlanabilmiştir. En yüksek sayıda torpedo devresine gelmiş somatik embriyo 0.5 mg/l 2,4-D bulunduran NN'in aydınlık kültürlerinde 912 adet olarak bulunmuştur.

Test edilen iki genotipte de 2. alt kültürden sonra olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından koyu kahverengi, kolay dağılabilir kalluslar elde edilmiştir. Koyu kahverengi kalluslardan 3-4 alt kültür sonra somatik embriyolar oluşmuştur (Şekil 5.1). Bu bulgular **Robacker (1993)**'in Muskadin üzümlerinden Regale ve Fry'n yaprak ve yaprak saplarından elde ettikleri kallusun tipiyle ve somatik embriyolar ile benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde **Martinelli ve ark. (1993)** *V. rupestris*'in yaprak saplarından, **Salunkhe ve ark. (1997)** *V. vinifera* çeşitleri Thompson, Sonaka ve Tas-e-Ganesh'in sülük eksplantlarından, **Salunkhe ve ark. (1999)** da *V. latifolia*'nın anterlerinden aynı tipte kalluslar elde etmişlerdir. Koyu kahverengi kallusların kültüre alınan asma eksplantlarının yüksek miktarda fenolik bileşik üretmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu düşünce **Jayasankar ve ark. (1999)** tarafından da desteklemektedir.



Şekil 5.1. 41 B nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantından elde edilen koyu kahverengi kalluslardan somatik embriyoların oluşumu

Somatik embriyo uyartımında genotipin çok fazla etkili olduğu belirlenmiştir. 41 B’de hemen hemen tüm ortamlarda somatik embriyo oluşmasına rağmen, Yalova İncisi’nde ancak üç uygulamada somatik embriyo oluşumu saptanmıştır. Bu bakımdan 41 B’den elde edilen en yüksek torpedo aşamasındaki embriyo sayısının 559 adet, Yalova İncisi’nde ise 912 adet olması dikkat çekici bulunmuştur.

Daha önce yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarda genotip olarak 41 B Amerikan Asma Anacı kullanılmış ve bazı problemlerle karşılaşmıştır. **Coutos-Thevenot ve ark. (1992)** çalışmalarında 41 B anacının süspansiyon kültüründe somatik embriyoların kalp devresinde durduğunu belirlemişler ve bunları her gün alt kültüre alarak embriyogenesis evrelerinin tamamlanmasını ve olgun embriyo oluşumunu sağlamışlardır. Bu yöntemin çok fazla zaman alması, maliyetinin yüksek olması ve enfeksiyon riskini artırması nedeniyle çok da pratik olmadığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise ortamlar üç ay gibi bir zaman aralığında değiştirilerek sorunla karşılaşmadan olgun embriyolar elde edilmiştir.

41 B’nin somatik embriyolarında çimlenme %51.8 ile %58.0 arasında değişirken, Yalova İncisinde çimlenme oranı %74.3 ile %77.4 düzeyinde olmuştur. Buna karşın tam bitkiye dönüşüm, 41 B’de Yalova İncisi’nden daha yüksek oranlarda meydana gelmiştir. 41 B’de maksimum tam bitkiye dönüşüm oranı %75 olur iken Yalova İncisi’nde %45 düzeyinde kalmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, elde edilen somatik embriyoların çimlenme ve bitkiye dönüşüm oranları genelde %50’nin üzerinde gerçekleşmiş olup bizim sonuçlar ile uyum içindedir. Örneğin **Martinelli ve ark. (1993)** araştırmalarında bazı *V. vinifera* ve *V. rupestris* çeşitlerinin yaprak saplarından elde ettikleri somatik embriyoların IBA bulunan ortamlarda %51 oranında çimlendiğini, **Gray ve Mortensen (1987)** BA bulunan ortamda kültüre aldıkları *V. longi*’nin anter ve yumurtalık eksplantlarından elde ettikleri somatik embriyolarda çimlenme oranının %50 olduğunu, **Goebel-Tourand ve ark. (1993)** Chardonnay çeşidinin anterlerinden elde edilen somatik embriyoların %70’inin çimlenip bitkicik oluşturduğunu, **Jayasankar ve ark. (1999)** ise anter ve yumurtalık eksplantlarından oluşturulan somatik embriyoları süspansiyon kültürlerinde %88 oranında bitkiciğe dönüştüğünü saptamışlardır.

Bazı araştırmacılar 3 mm den büyük somatik embriyoların çimlenmesi için soğuklatılmaları gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Bu embriyoların yüksek miktarda ABA içerikleri nedeniyle dinlenmeye girdikleri düşünülmektedir. Araştırmacılara göre 1 mm den küçük embriyolar ise yeterince olgunlaşmamış olduklarından çimlenememektedir (Emershad ve Ramming 1994). Rajasekaran ve Mullins (1979), Mauro ve ark. (1986) ve Martinelli ve ark. (1993) ile Trautmann ve Burger (1997) gibi araştırmacılar da dinlenmenin kırılması için embriyoların soğuklatılmaları gerektiğini bildirmektedir.

Bu tezde 1-3 mm büyüklüğünde kullanılan somatik embriyolar soğuklatmaya gerek kalmadan çimlenebilmişlerdir.

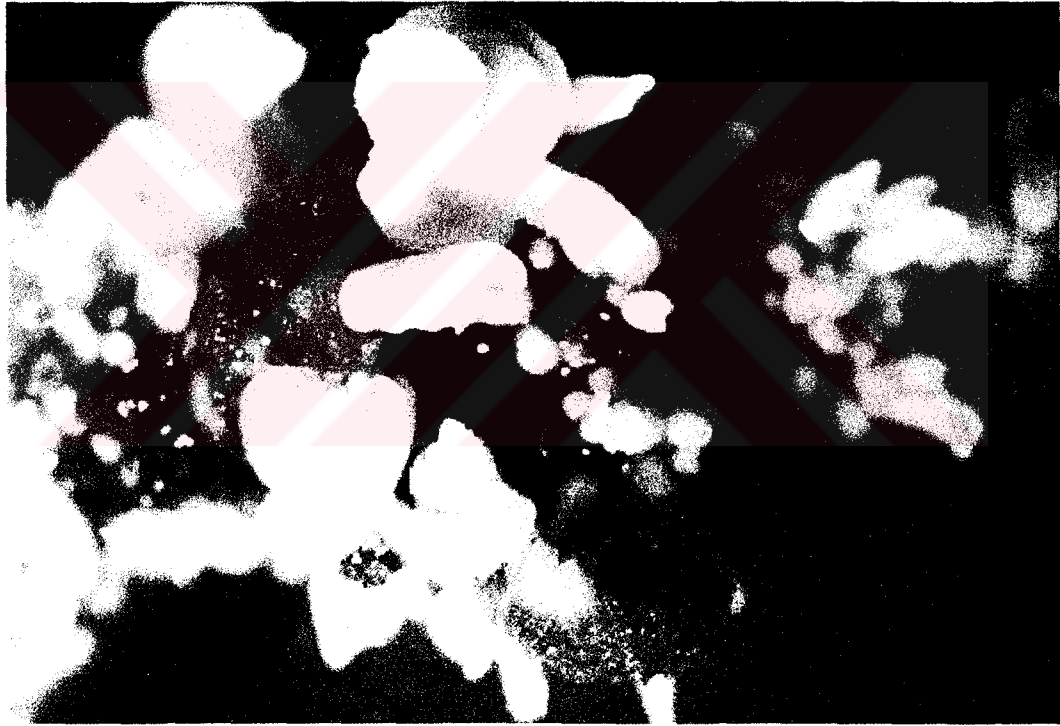
Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, somatik embriyo oluşumunun genotipe ve eksplant kaynağına göre değiştiğini göstermiştir. Olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarının 8 aylık kültür süreleri sonunda 41 B'de %30 oranında somatik embriyo ve 559 adet torpedo devresinde embriyo; Yalova İncisi'nde ise %6.3 oranında somatik embriyo ve 912 adet torpedo devresinde embriyo bulunmuştur.

Somatik embriyo oluşumu, 41 B'nin olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantında ayda bir olmak üzere iki kez, üç ayda bir olmak üzere bir kez alt kültüre alınma sonucunda gözlenirken; Yalova İncisi'nde ayda bir, iki kez ve üç ayda bir, iki kez alt kültüre alındığında eksplantlarda somatik embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Bu süre sonunda yani 41 B'de 5 ay sonra, Yalova İncisi'nde 8 ay sonra kalluslardan globular, kalp, torpedo ve kotiledon devresinde embriyoların oluştuğu görülmüştür (Şekil 5.2).

İkinci üç ay sonunda eksplantlarda oluşan torpedo aşamasındaki embriyolar oluştukları ortamın hormonsuzuna aktararak çimlenmeleri sağlanmıştır. MS ortamında meydana gelen globular ve kalp devresindeki embriyolar hormonsuz ½ MS ortamında kültüre alınarak torpedo aşamasına gelmeleri sağlanmıştır. Bunlar daha sonra tam güçte MS ortamında çimlendirilip tam bitkicik elde edilmiştir.

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D eklenen MS, NN ve B5 ortamlarına yerleştirilen olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantlarından embriyojenik kalluslar elde edilmiştir. Önceki çalışmalar incelendiğinde elde edilen bu kallusların, hormon içermeyen ortamda veya embriyo uyartımını sağlamak

amacıyla ortama eklenen hormon veya hormonların etkisiyle somatik embriyo oluşturması gerektiği sonucu çıkarılabilmektedir. Ancak bu çalışmada elde edilen kalluslar hormon içermeyen ortamlarda kültüre alındığında somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Bizim çalışmamızda somatik embriyoların kallus oluşturmak amacıyla ortama eklenen 2,4-D'nin üç aylık kültür süresinde azalan miktarının uyarıcı etkisiyle meydana geldiği düşünülmektedir. **Martinelli ve ark. (1991)** da buna benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Araştırmacılar, kazein hidrolizat ekli NN ortamına yerleştirilen somatik embriyoların olgunlaşıp tam bitkiye dönüşmesi için soğuklatmaya ve derece derece azalan büyüme düzenleyicisine ihtiyaç duyduklarını bildirmişlerdir.



Şekil 5.2. 41 B anacının olgunlaşmamış zigotik embriyolarından elde edilen farklı gelişme devrelerindeki somatik embriyolar

Bizim çalışmamızda, somatik embriyo elde etmek için kullanılan eksplantlar içinde en uygun eksplantın olgunlaşmamış zigotik embriyo olduğu belirlenmiştir. **Emershad ve Ramming (1994)** de stenospermokarpik üzümün ovüllerini kullanarak hormonsuz ortamda *in ovulo* embriyo kültürü yaptıklarında olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyolar elde etmişlerdir.

Emershad ve Ramming (1994)'in bildirdiğine göre Tisserat ve ark. (1979) yaptıkları bir çalışmada *in vitro*'da kültüre alınan ovüllerde bulunan genç embriyoların, olgun ve daha yaşlı embriyolardan daha iyi embriyojenik kültürler oluşturduklarını belirlemişlerdir.

41 B'nin olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantı, denemede kullanılan bazı uygulamalarda hiç kallus oluşturmamış, bazı uygulamalarda ise çok düşük oranda kallus oluşturmıştır. Bu embriyoların dinlenme halinde olduğu ve yüksek oranda ABA içermesi nedeniyle kallus oluşturmadağı düşünülüp bu eksplantlarda soğukta katlama yapmanın dinlenmeyi kıracağı, dolayısıyla kallus oluşumuna olumlu katkı yapılacağı düşünülmüştür. + 4°C'de 6 hafta süreyle nemli kum içerisinde katlamaya alınan tohumlardan izole edilen olgunlaşmış zigotik embriyolar denemede kullanılan uygulamalar çerçevesinde kültüre alındığında kallus oluşturmayan uygulamalarda da çok belirgin olarak kallus oluştuğu ve kallus oluşanlarda da oranların yükseldiği görülmüştür. Yalova İncisi'nde ise eksplantlar katlamaya alınmadan da 41 B'ye göre nispeten daha iyi sonuç vermiştir. Bu durum, muhtemelen erkenci bir çeşit olan Yalova İncisi'nde üzümlerin olgunlaştığı dönemde tohumların yeterince olgunlaşmamış ve dolayısıyla henüz dinlenmeye girmemiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çeşitte de kallus oluşum oranlarını daha da arttırabilir düşüncesiyle + 4°C'de 6 hafta katlama yapılmış ancak kullanılan bir çok ortam ve 2,4-D'nin aydınlık ve karanlık koşullarında yoğun bakteri zararı ortaya çıkmıştır. Daha sonraki denemelerde ortama antibiyotik eklenmiş bunun da olgun zigotik embriyoların gelişmesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Elde edilen somatik embriyoların dışarıya aktarılmasında kontrollü koşulların çok önemli olduğu belirlenmiştir. Oda sıcaklığında yarı gölge bir yerde tutulan bitkilerde yaşama oranı %63 iken kontrollü koşullarda büyütme odasında tutulan bu bitkiciklerde yaşama oranı %91.9' lara çıkmıştır. Bu da uygun koşullar sağlandığında *in vitro* bitkiciklerin dış koşullara adapte edilmelerinde bir sorun olmadığını açıkça göstermiştir. Jayasankar ve ark. (1999) da somatik embriyogenesis yoluyla elde ettikleri bitkilerin %90'dan fazlasını toprağa aktarmışlardır.

5.2. Organogenesis

41 B ve Yalova İncisi'nin yaprak eksplantında en yüksek adventif göz oluşumu B5 ortamına eklenen 2 mg/l BA'nın aydınlık kültürlerinde (sırasıyla %70 ve %25) meydana gelmiştir. En yüksek değerde ortalama adventif göz sayısı 41 B'de 2 mg/l BA bulunan B5 ortamının karanlık kültürlerinden 2.8 adet olarak saptanmış; Yalova İncisi'nde ise 2 mg/l BA içeren NN ortamının karanlık kültürlerinden 1.7 adet olarak elde edilmiştir.

Yaprak sapı eksplantından, 41 B'de en yüksek oranda adventif göz oluşumu, 2 mg/l BA içeren NN ortamının karanlık kültürlerinde %32.1 oranında saptanmıştır. Yalova İncisi'nde ise en iyi sonucu 1 mg/l BA bulunduran MS ortamının aydınlık ve karanlık kültürleri (sırasıyla %10.7 ve %10) vermiştir. Her iki genotipte de kullanılan eksplantlardan ortalama birer adet adventif göz elde edilmiştir.

Adventif göz oluşumu üzerine genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamı ile kültür koşullarının etkili olduğu saptanmıştır. Organogenesis çalışmalarında adventif sürgün oluşumunun tür ve çeşitlere göre değiştiği daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Stamp ve ark., 1990; Tang ve Mullins, 1990; Clog ve ark., 1990; Baydar, 2000).

Çalışmada yaprak ayaları, yaprak saplarına göre nispeten daha iyi sonuç vermiştir. Eksplant başına elde edilen ortalama göz sayısının, yaprak ayasında 1.7 adet, yaprak sapında 1 adet olduğu belirlenmiştir. Tang ve Mullins (1990) de yaprak ayalarının, yaprak saplarına göre daha başarılı olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, eksplant başına düşen sürgün sayısının yaprak ayalarında 1-12 adet, yaprak saplarında ise 1-6 adet olduğunu bildirmişlerdir.

Clog ve ark. (1990) BAP katılmayan ortamlarda eksplantların öldüğünü BAP eklendiğinde adventif sürgün sayısının arttığını belirlemişlerdir. 1 ile 1.5 mg/l BAP konsantrasyonunun adventif sürgün gelişimi için en uygun olduğunu belirleyen araştırmacılar BAP'ın daha yüksek konsantrasyonlarında eksplantların kallus oluşturduğunu saptamışlardır. Stamp ve ark. (1990) da 2 mg/l BA konsantrasyonunun adventif sürgün oluşumunu olumlu yönde etkilediğini belirlemişlerdir. Baydar (2000), yaprak saplarını eksplant olarak kullandığında

eksplant başına ortalama sürgün sayısının 7.6 adet, yaprak ayası kullanıldığında bu değerin 7.2 olduğunu saptamıştır. Araştırmacı, adventif sürgün oluşturan eksplantların oranı ve eksplant başına elde edilen ortalama sürgün sayısı bakımından en düşük değerleri (2.4 adet) 41 B'den elde etmiştir. **Clog ve ark. (1990)** da kullandıkları genotipler arasında en düşük rejenerasyonu 41 B'den elde etmişlerdir.

Organogenesis çalışmalarında adventif göz oluşumunu teşvik etmek için mutlaka besin ortamına BA'nın katılması gerektiği belirtilmektedir. **Clog ve ark. (1990)** büyütme kabinde yetiştirilen bitkilerden aldıkları yapraklarda 25 gün sonra meristematik alanın, 30 gün sonra sürgünlerin büyüdüklerini görmüşlerdir. *In vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan yapraklarda ise meristematik bölge 10 gün sonra görünür hale gelmiş ve 15 gün sonra sürgünler oluşmuştur. Sonuçlar rejenerasyon kapasitesinin eksplant kaynağı (*in vivo*, *in vitro*) ile kontrol edildiğini göstermiştir.

Çalışmamızda, yaprak ayalarındaki adventif göz uyartımı 1 - 2 aylık kültür süresi sonunda yaprak sapının kesildiği yüzeylerde kabarma şeklinde görünmeye başlamıştır. Elde edilen adventif gözler direkt olarak meydana gelmiştir. **Martinelli ve ark. (1996)** da genç yapraklardan sürgün rejenerasyonunu, 80 günlük kültür süresi boyunca yaprak sapının kesilen yüzeyinden doğrudan organogenesis yoluyla sağlamışlardır. **Colb ve ark. (1991)** da araştırmalarında benzer sonuçlar elde etmiştir. **Martinelli ve ark. (1996)**'nın yaptıkları bir çalışmada organogenesisin direkt veya indirekt olması durumu çeşitlere göre değişmiştir. *V. armata*, *V. simpsonii* ve Sultana moscato'da bitki rejenerasyonu kallustan sonra yani indirekt olur iken; Sultano moscato da rejenerasyon kallus oluşmaksızın yaprağın orta damarından direkt olarak gerçekleşmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırma sonunda elde edilen sonuçlar somatik embriyogenesis ve organogenesis için ayrı ayrı ve maddeler halinde sunulmuştur:

6.1. Somatik Embriyogenesis

1. 41 B anter eksplantından embriyojenik kalluslar elde edilmiş ancak somatik embriyo uyartımı sağlanamamıştır. Somatik embriyo elde edilmesi için embriyojenik kallusların B5 ortamına eklenecek farklı NAA ve BA veya başka hormon ve kombinasyonlarında kültüre alınmasında yarar olduğu düşünülmektedir. Yalova İncisi anterlerinden kallus elde edilememiştir. Bunun için 2,4-D ve BA kombinasyonları dışında IBA, IAA, NAA, NOA ve IASP gibi başka hormonların konsantrasyonları ve kombinasyonlarının denenmesi önerilmektedir.

2. Yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantlarının *in vitro*'da yetiştirilen bitkiciklerden alınması daha uygun bulunmuştur.

3. Yaprak ayası, yaprak sapı ve sülük eksplantlarından değişik oranlarda embriyojenik kallus elde edilmiştir. Ancak embriyojenik kalluslar hormonsuz ortamda kültüre alındığında herhangi bir embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Bu eksplantlar için 2,4-D'nin yalnız değil BA ile kombine edilerek denenmesi ve elde edilen embriyojenik kallusların hormonsuz ortamda kültüre alınmasıyla somatik embriyolar elde edilebilir. Ya da elde edilen embriyojenik kalluslarda embriyo uyartımını sağlamak amacıyla ortama BAP gibi değişik büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarının eklendiği başka araştırmaların yapılması tavsiye edilmektedir.

4. Olgunlaşmış zigotik embriyo eksplantından değişik oranlarda kallus elde edilmiştir. Elde edilen kallus miktarını ve oranını artırmak amacıyla +4 °C de farklı sürelerde katlama, karbon kaynağı olarak değişik karbohidratların (sakkaroz, glikoz, fruktoz ve maltoz) farklı konsantrasyonları yanında, değişik katılaştırıcılar ve oksinler denemeye alınabilir. Daha sonra bu embriyojenik kalluslardan embriyo uyartımını sağlamak amacıyla değişik hormon kombinasyonları ve

konsantrasyonları, organik asitler, amino asitler (prolin, glutamin, arginin vs) , farklı pH ve karbon kaynağı denenebilir.

5. Kullanılan eksplantlar içerisinde en başarılı sonucu olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantı vermiştir. 41 B anacı çoğu ortamda embriyo oluştururken, Yalova İncisi seçici olmuş çok az ortamda embriyo oluşturmuştur. Bu durum genotip ve eksplantın önemini bir kez daha göstermiştir.

Asmada somatik embriyogenesis yoluyla bitki elde etmeyi amaçlayan bu çalışmada uygulanması kolay ve yüksek verimlilikte bir protokol belirlenmiştir. Bu protokol aşağıda 41 B anacı ve Yalova İncisi üzüm çeşidi için ayrı ayrı sunulmuştur (Şekil 6.1 ve Şekil 6.2)

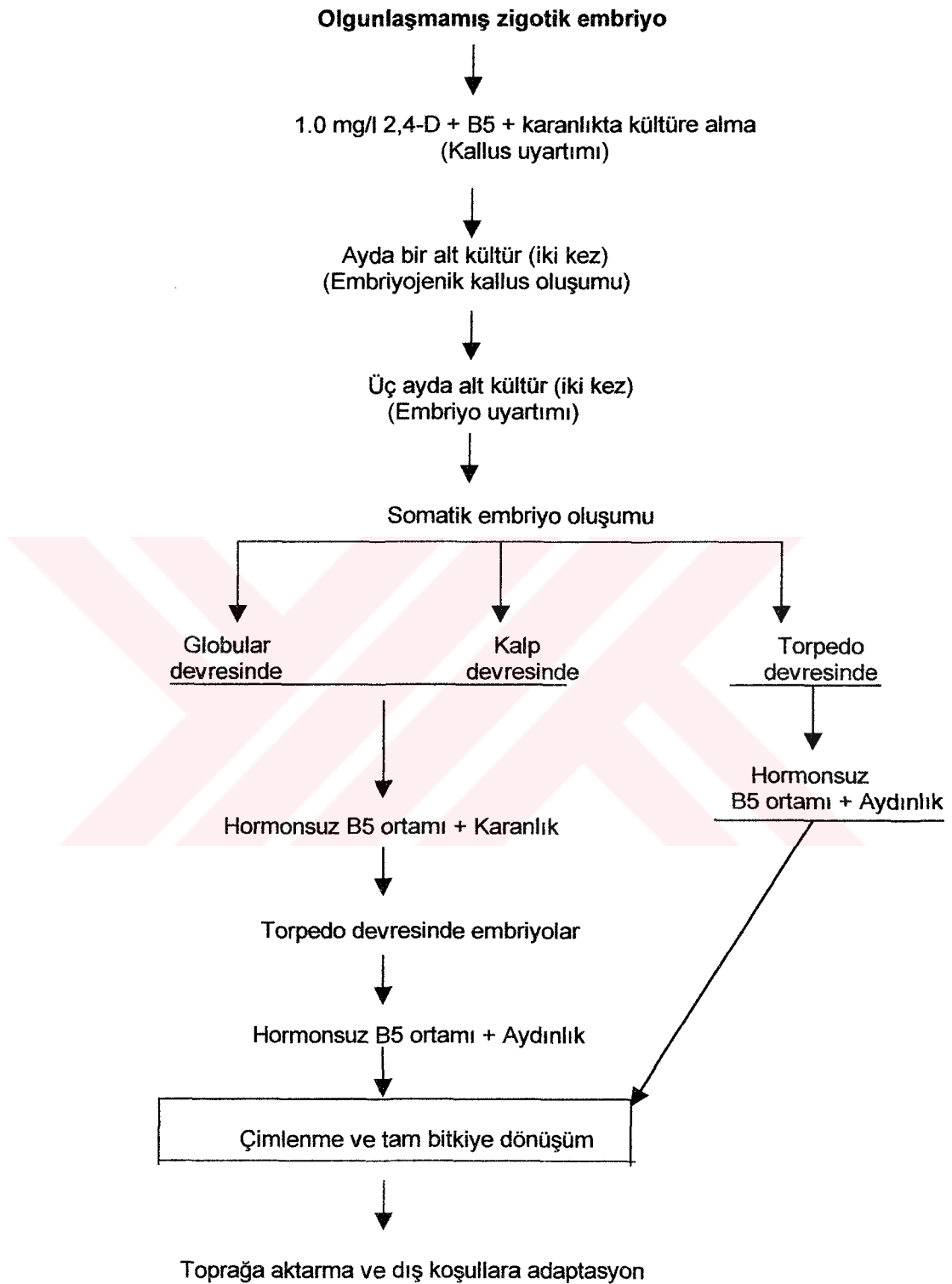
En iyi sonucun olgunlaşmamış zigotik embriyo eksplantından alınması oldukça olumlu bulunmuştur. Bu durum, protokolün özellikle stenospemokarpik çekirdeksiz çeşitler için de kullanılabilme şansını arttırmaktadır.

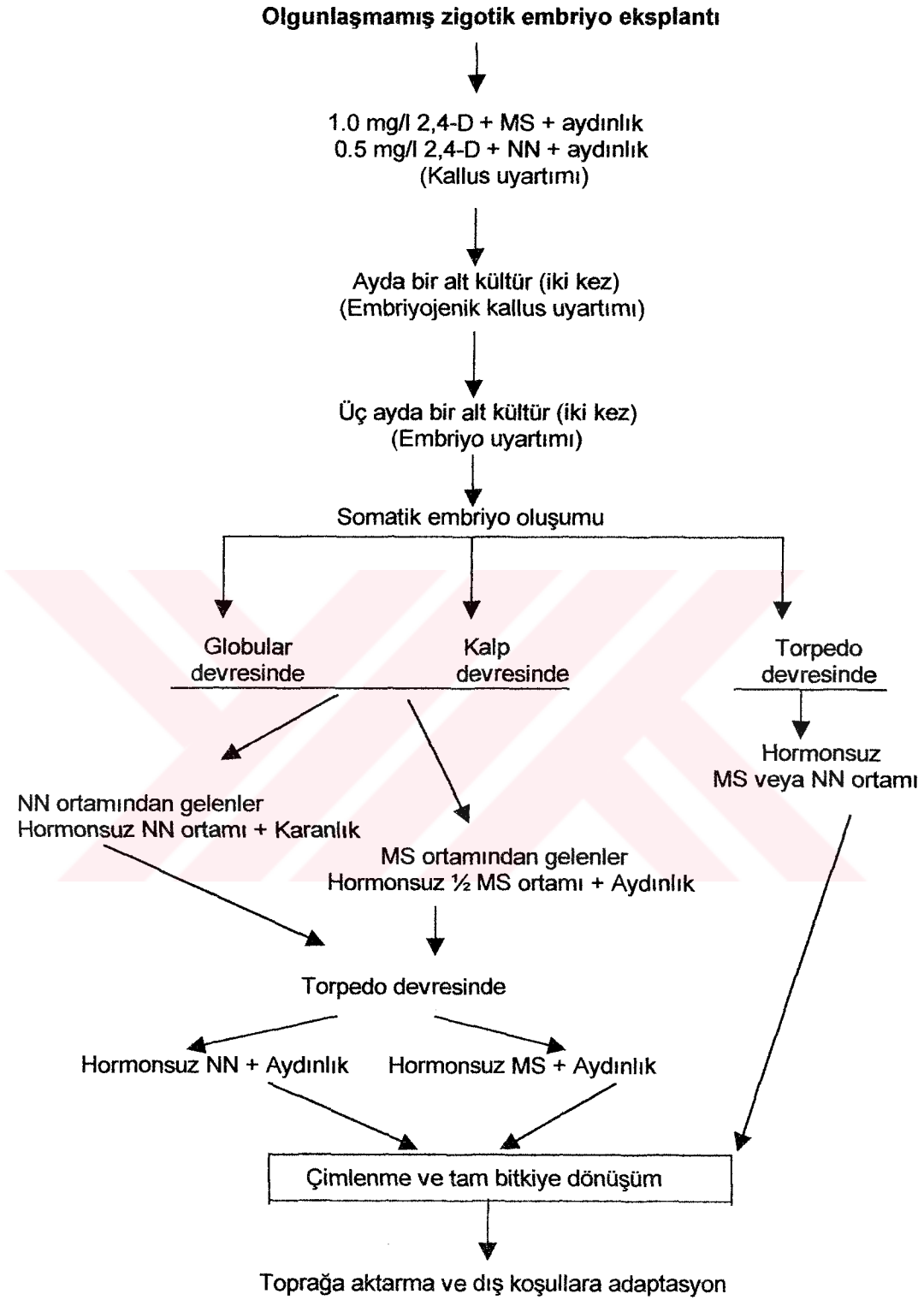
Geliştirilen bu protokolde de incelenmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda sunulmuştur:

a) Aynı ortam ve hormon konsantrasyonunda aynı süre içinde eksplantlar üzerinde çok farklı devrelerde bulunan somatik embriyolar tespit edilmiştir. Bu da çimlenme sırasında sorunlar yaratabilmektedir. Bu nedenle somatik embriyoların çoğunun aynı dönemde olgunlaşmasını sağlamak gerekmektedir. Farklı devredeki embriyoları olgunlaştırıp daha yüksek oranda çimlenme elde etmek için ABA uygulamasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada farklı ABA konsantrasyonları denenmiştir ancak embriyolarda anormallikler görülmüştür ABA'nın bu açıdan incelenmesinde yarar görülmektedir.

b) Araştırmamız sonunda elde edilen bu protokol kitle halinde üretim yapmak amacıyla biyoreaktöre uyarlanmalıdır.

Elde edilen bu protokolün asmada somaklonal varyasyon oluşturma ve ayrıca dolaylı ıslah çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği ortaya konulmuştur. Somatik embriyogenesiste elde edilen bu sonuçların özellikle asma genetik kaynaklarımızın geliştirilmesine büyük katkılar sağlanacağı umulmaktadır.





Şekil 6.2. Yalova İncisi için geliştirilen somatik embriyogenesis protokolü

6.2. Organogenesis

1. Organogenesis çalışmalarında kullanılan yaprak ayası eksplantları yaprak saplarına göre daha başarılı bulunmuştur. Denemede kullanılan her iki genotipte de farklı oranlarda adventif göz oluşumu sağlanmıştır. Adventif göz oluşumunda BA'nın 2 mg/l konsantrasyonunun çok daha etkili olduğu ve en uygun ortamların da B5 ve NN olduğu belirlenmiştir.

2. Elde edilen adventif gözlerden, sürgün elde etmede sorunlar yaşanmıştır. Eksplantlar alt kültüre alındıklarında kallus oluşturmuşlar ve adventif gözlerin kaybolmasına neden olmuşlardır. Başlangıçta oluşan adventif gözlerin sürgün oluşturup tam bitkiciğe dönüşmesi için sonraki çalışmalarda ortam ve hormon denemelerinin yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- BARLASS, M. and SKENE, K. G. M., 1978.** *In Vitro* Propagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) from Fragmented Shoot Apices. *Vitis*, 17: 335-340.
- BAYDAR, N. G. 2000.** Asmada (*Vitis spp.*) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. *Turkish J. of Biol.*, 24(3): 645-656.
- BENSAAD, Z. M., HENNERTY, M. J. and ROCHE, T. D., 1996.** Effects of Cold Pretreatment, Carbohydrate Source and Gelling Agents on Somatic Embryogenesis from Anthers of *Vitis vinifera* L. cvs. 'Regina' and Reichensteiner'. *Proc. Int. Sym. Plant Production in Closed Ecosystems Acta Hort.*, 440: 504-509.
- BERRER, R., OTTEN, L., TINLAND, B., MALGARINI-CLOG, E. and WALTER, B., 1992.** Transformation of Vitis Tissue by Different Strains of *Agrobacterium tumefaciens* Containing the T-6b Gene. *Plant Cell Reports*, 11: 192-195.
- BÜYÜKALACA, S., 1993.** Somatic Embryogenesis of *Capsicum annuum* L. (Sweet pepper). University of Manchester, Department of Chemical Engineering. Manchester, UK. (Doktora Tezi). 265 s.
- BÜYÜKDEMİRCİ, H., 1997.** *In vitro* Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves and Axillary Buds of Grapevine (*Vitis spp.*). *Fac. of the Graduate Col. at the Univ. of Nebraska (Yüksek Lisans Tezi)*. 122 s.
- CERSOSIMO, A., CRESPIAN, M., PALUDETTI, G., and ALTAMURA, M. N., 1990.** Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration from Anther Culture in *Vitis*. 1st International Symposium ,in Vitro Culture and Horticultural Breeding. *Acta Hort.*, 280: 307-314.
- CHEE, R. and POOL, R. M., 1987.** Improved Inorganic Media Constituents for the *In Vitro* Shoot Multiplication of *Vitis*. *Scientia Hort.*, 32: 85-95.
- CHENG, Z. M., and REISCH, B. I., 1990.** Shoot Regeneration From Petioles and Leaves of *Vitis x labruscana* "Catawba". *Plant Cell Reports*, (1989) 8(7): 403-406. *Hort. Abstr.*, 60(7): 5046.
- CLOG, E., BASS, P. and WALTER, B., 1990.** Plant Regeneration By Organogenesis in *Vitis* Rootstock Species. *Plant Cell Reports*, 8: 726-728.

- COLBY, S. M., JUNCOSA, A. M. and MEREDITH, C. P., 1991.** Cellular Differences in *Agrobacterium* Susceptibility and Regenerative Capacity Restrict the Development of Transgenic Grapevines. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 116(2): 356-362.
- _____, _____, **STAMP, J. A. and MEREDITH, C. P. 1992.** Developmental Anatomy of Direct Shoot Organogenesis from Leaf Petioles of *Vitis Vinifera* (Vitaceae). Amer. J. of Botany (1991) 78(2): 260-269. Hort. Abstr., 62(2): 1050.
- COUTOS-THEVENOT, P., GOEBEL-TOURAND, I., MAURO, M.-C., JOUANNEAU, J.-P., BOULAY, M., DELOIRE, A. and GUERN, J., 1992.** Somatic Embryogenesis from Grapevine Cells. I- Improvement of Embryo Development by Changes in Culture Conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29: 125-133.
- ÇELİK, S., 1998.** Bağcılık (Ampeloloji) Cilt- 1. Trakya Üniv., Tekirdağ Ziraat Fak., Bahçe Bitkileri Bölümü. Anadolu Matbaa Ambalaj San. ve Tic. Ltd. Şti. Tekirdağ. 426 s.
- DARLINGTON, C. D. and LA COUR, L. F. 1963.** Methoden der Chromosomenuntersuchungen. Frankische Verlagshandlung, W. Keller und Ca., Stuttgart.
- EMERSHAD, R. L. and RAMMING, D. W., 1994.** Somatic Embryogenesis and Plant Development From Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Reports, 14: 6-12.
- FAURE, O., AARROUF, J. and NOUGAREDE, A., 1996 a.** Ontogenesis, Differentiation and Precocious Germination in Anther-Derived Somatic Embryos of Grapevine (*Vitis vinifera* L.): Proembryogenesis. Hort. Abstr., 66(11): 9384.
- _____, _____ and _____, **1996 b.** Ontogenesis, Differentiation and Precocious Germination in Anther-Derived Somatic Embryos of Grapevine (*Vitis vinifera* L.): Embryonic Organogenesis. Hort. Abstr., 66(11): 9385.

- GALL, O. L., TORREGROSA, L., DANGLLOT, Y., CANDRESSE, T. and BOUQUET, A., 1994.** *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Grapevine Somatic Embryos and Regeneration of Transgenic Plants. Expressing the Coat Protein of Grapevine Chrome Mosaic Nepovirus (GCMV). *Plant Science*, 102: 161-170.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R.A and OJIMA, K., 1968.** Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- GEORGE, E. F., 1993.** Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Tecnology, 10-36.
- GOEBEL-TOURAND, I., MAURO M.-C., SOSSOUNTZOV, L., MIGINIAC, E. and DELOIRE, A., 1993.** Arrest of Somatic Embryo Development in Grapevine: Histological Characterization and the Effect of ABA, BAP and Zeatin in Stimulating Plantlet Development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 91-103.
- GÖLLES, R., MOSER, R., KATINGER, H., LAIMER DA CAMARA MACHADO, M., DA CAMARA MACHADO, A., TSOLOVA, V. and BOUQUET, A. 1997.** Transformation of Somatic Embryos of *Vitis* Sp. with Different Counstructs Containing Nucleotide Sequences from Nepovirus Coat Protein Genes. *Acta Hort.*, 447: 265-272
- GRAY, D. J. and MORTENSEN J. A., 1987.** Initiation and Maintenance of Long Term Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9: 73-80.
- HATİPOĞLU, R., 1997.** Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No:A-58. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Ofset Atölyesi Adana. 176 s.
- HIRABAYASHI, T., KOZAKI, I. and AKIHAMA, T., 1976.** *In Vitro* Differentiation of Shoot from Anther Callus in *Vitis*. *HortScience*, 11(5): 511-512.
- JAYASANKAR, S., GRAY, D. J. and LITZ, R. E., 1999.** High-Efficiency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Grapevine. *Plant Cell Reports*, 18: 533-537.

- KALYON, D. ve AĞAOĞLU, Y.S., 1999.** Asmalarda Anter Kùltüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Soğuk Uygulamaları ve Büyüme-yi Düzenleyicilerin Etkileri. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi: 378-382.
- KIKKERT, J. R., HEBERT-SOULE, D., WALLACE, P., STRIEM, M. and REISCH, B. I., 1996.** Transgenic Plantlets of Chancellor Grapevine (*Vitis* sp.) from Biolistic Transformation of Embriyogenic Cell Suspensions. Plant Cell Rep., 15: 311-316.
- _____, **ALI, G. S., STRIEM, M. J., MARTENS, M. H. WALLACE, P. G., MOLINO, L. and REISCH, B. I., 1997.** Genetic Engineering of Grapevine (*Vitis* sp.) for Enhancement of Disease Resistance. Acta Hort., 447: 273-279.
- KRUL, W. R. and WORLEY, J. F., 1977.** Formation of Adventitious Embryos in Callus Cultures of ‘Seyval’, A French Hybrid Grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(3): 360-363.
- LANGENBUCHER, M. H. and ALLEWELTDT, G., 1993.** Einfluss verschiedener Vorbehandlungen auf die Induktion somatischer Embryogenese ander Antheren der Rebsorte Riesling. Vitis, 32: 1-7.
- LIPSKY, A. Kh., SAHAR, N., HOLLAND, D., FLAISMAN, M. A. and PERL, A., 1997.** Development and Growth of Embriyogenic Suspension Cultures of *Vitis vinifera* cvs in Bioreactor as a System for Genetic Transformation. Acta Hort., 447: 313-316
- LU, B. Z., YU, X. R., GUO, F. Y., Lİ, P. F. and BAO, X. Z., 1996.** Study on Embryogenesis in Grape Filaments Cultured *in Vitro*. Hort. Abstr., 66(2): 1228.
- MAITZ, M., TRAMPLER, F., GRÖSCHL, M., CAMARA MACHADA, A. DA. and LAIMER DA CAMARA MACHADA, M., 2000.** Use of an Ultrasound Cell Retention System for the Size Fractionation of Somatik Embryos of Woody Species. Plant Cell Reports, 19: 1057-1063.

- MARTINELLI, L., GIANAZZA, E. and VILLA, P. L., 1991.** Somatic Embryogenesis from Leaves and Petioles of Grapevine. International Symposium on Plant Biotechnology and Its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement. Acta Hort., 289: 243-244.
- _____, **BRAGAGNA, P., POLETTI, V. and SCIENZA, A., 1993.** Somatic Embryogenesis from Leaf- and Petiole-Derived Callus of *Vitis rupestris*. Plant Cell Reports, 12: 207-210.
- _____, **POLETTI, V., BRAGAGNA, P. and POZNANSKI, E. 1996.** A Study on Organogenic Potential in the *Vitis* Genus. Vitis, 35(4): 159-161.
- _____, **GRIBAUDO, I., BERTOLDI, D., CANDIOLI, E. and POLETTI, V., 2001.** High Efficiency Somatic Embryogenesis and Plant Germination in Grapevine Cultivars Chardonnay and Brachetto a Grappolo Lungo. Vitis, 40(3): 111-115.
- MATSUTA, N. and HIRABAYASHI, T., 1989.** Embryogenic Cell Lines from Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Reports, 7: 684-687.
- MAURO, M. CL., NEF, C. and FALLOT, J., 1986.** Stimulation of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Plant Cell Reports, 5: 377-380.
- MOZSAR, J. and SÜLE, S., 1994.** A Rapid Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cultured Anthers of *Vitis riparia*. Vitis, 33: 245-246.
- _____ **and VICZIAN, O., 1996.** Genotype Effect on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Vitis spp.* Vitis, 35 (4): 155-157.
- MULLINS, M. G. and SRINIVASAN, C., 1976.** Somatic Embryos and Plantlets From an Ancient Clone of the Grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by Apomixis *In Vitro*. Journal of Experimental Botany, 27(100): 1022-1030.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. M., 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tabacco Tissue Cultures. Pysiol. Plant., 15: 473-497.

- NAKANO, M., SAKAKIBARA T., WATANABE Y., and MN, M., 1997. Establishment of Embryogenic Cultures in Several Cultivars of *Vitis vinifera* and *V. labruscana*. *Vitis*, 36 (3): 141-145.
- NITSCH, J. and NITSH, C., 1969. Haploid Plants From Pollen Grains. *Science*, 163: 85-87.
- ORAMAN, M. N., 1959. Ampelografi. A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları: 154. Ders Kitabı:50. A.Ü. Basımevi, Ankara, 128 s.
- PERL, A., SAAD, S., SAHAR, N. and HOLLAND, D., 1995. Establishment of Long-Term Embryogenic Cultures of Seedless *Vitis vinifera* Cultivars- A Synergistic Effect of Auxins and the Role of Absciscic Acid. *Plant Science*, 104: 193-200.
- _____, LOTAN, O., ABU-ABIED, M. and HOLLAND, D., 1996 a. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated Transformation System for Grape (*Vitis vinifera* L.): The Role of Antioxidants During Grape-*Agrobacterium* Interactions. *Nature Biotechnology*, 14: 624-628.
- _____, GOLLOP, R., LIPSKY, A., HOLLAND, D., SAHAR, N., OR, E., and ELYASI, R., 1996 b. Regeneration and Transformation of Grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2(4): 187-193.
- POPESCU, C. F., 1997. Somatic Embryogenesis and Plant Development from Anther Culture of *Vitis vinifera* L. *Hort. Abstr.*, 67 (4): 2851.
- RAJASEKARAN, K. and MULLINS, M. G., 1979. Embryos and Plantlets from Cultured Anthers of Hybrid Grapevines. *J. of Experimental Botany*, 30(116): 399-407.
- RAJASEKARAN, K. and MULLINS, M. G., 1981. Organogenesis in Internode Eksplants of Grapevines. *Vitis*, 20: 218-227.
- _____ and _____ 1983. Influence of Genotype and Sex-expression on Formation of Plantlets by Cultured Anthers of Grapevines. *Agronomie*, 3(3): 233-238.
- REGNER, F., STADLHUBER, A. and ROMANN, H., 1997. Somatic Embryogenesis in Grapevine (*Vitis vinifera*). *Hort. Abstr.*, 67 (4): 2852.

- REUSTLE, G., HARST, M. and ALLEWELDT, G., 1994. Regeneration of Grapevine (*Vitis sp.*) Protoplasts. *Vitis*, 33: 173-174.
- ROBACKER, C., 1993. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration From Muscadine Grape Leaf Explants. *HortScience*, 28(1): 53-55.
- SALUNKHE, C. K., RAO, P. S. and MHATRE, M., 1997. Induction of Somatic Embryogenesis and Plantlets in Tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports*, 17: 65-67.
- _____, _____ and _____ 1999. Plantlet Regeneration via Somatic Embryogenesis in Anter Callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Reports*, 18: 670-673.
- SCORZA, R., CORDTS, J. M., RAMMING, D. W. and EMERSHAD, R. L., 1995. Transformation of Grape (*Vitis vinifera* L.) Zygotic-derived Somatic Embryos and Regeneration of Transgenic Plants. *Plant Cell Reports*, 14: 589-592.
- _____, _____, GRAY, D. J., GONSALVES, D., EMERSHAD, R. L. and RAMMING, D. W., 1996. Producing Transgenic "Thompson Seedless" Grape (*Vitis vinifera* L.) Plants. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(4): 616-619.
- SINGH, Z. and BRAR, S. J. S., 1993. *In Vitro* Plant Regeneration in Seedless Grapes (*Vitis vinifera* L.) *Vitis*, 32: 229-232.
- STAMP, J. A. and MEREDITH, C. P., 1988 a. Proliferative Somatic Embryogenesis from Zygotic Embryos of Grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113(6): 941-945.
- _____ and _____, 1988 b. Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35: 235-250.
- _____, COLBY, S. M. and MEREDITH, C. P., 1990 a. Improved Shoot Organogenesis from Leaves of Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115 (6): 1038-1042.
- _____, _____, and _____ 1990 b. Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22 : 127-133.

- TANG, F. A. and MULLINS, G. M., 1990.** Adventitious Bud Formation in Leaf Explants of Some Grapevine Rootstock and Scion Cultivars. *Vitis*, 29: 151-158.
- TANGOLAR, S., ERGENOĞLU, F. ve GÖK, S., 1996.** Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma Bağı Üzüm Çeşitleri Kataloğu. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Yardımcı Ders Kitapları No:29. Ç.Ü. Zir. Fak. Ofset Atölyesi, Adana. 94 s.
- _____, **GÖK, S., ERGENOĞLU, F. ve ÇETİNER, S., 1998.** Bazı Çekirdeksiz Üzüm Çeşitlerinin Embriyo Kültüründen Yararlanılarak Çoğaltılması. *Türk Tar. ve Orm. Dergisi*, 21: 1-6.
- TORREGROSA, L., TORRES-VIALS, M. and BOUQUET, A., 1995.** Somatic Embryogenesis from Leaves of *Vitis x Muscadinia* Hybrids. *Vitis*, 34(4): 239-240.
- TRAUTMANN, I. A. and BURGER, P., 1997.** Prerequisites for High Frequency Germination of Somatic Embryos of *Vitis vinifera*. *Acta Hort.*, 447: 95-101.
- VALLANIA, R., MIAJA, M. L., VERGANO, G., BOTTA, R., ME, G., ZANETTI, R. and GRIBAUDO, I., 1996.** Somatic Embryogenesis in Grapevine *Vitis vinifera* L. *Hort. Abstr.*, 66(5): 3959.
- VILAPLANA, M. and MULLINS M. G., 1989.** Regeneration of Grapevines (*Vitis Spp*) in *Vitro* Formation of Adventitious Buds on Hypocotyls and Cotyledons of Somatic Embryos. *Journal of Plant Physiology* (1989) 134(4): 413-419. *Hort. Abstr.*, 59(11): 8955.
- YOUNGJU, K., CHANGHOO, L. and NAMIN, H., 2001.** Effects of Medium Composition and Culture Condition on Plant Regeneration via Organogenesis of 'Kyoho' Grape. *Hort. Abstr.*, 71(1): 172.
- ZHU, Y.-M., HASHINO, Y., NAKANO, M., TAKAHASHI, E. and MII, M., 1997.** Highly Efficient System of Plant Regeneration from Protoplasts of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Through Somatic Embryogenesis by Using Embryogenic Callus Culture and Activated Charcoal. *Plant Science*, 123: 151-157.

ZIMMERMAN, J. L., 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5: 1411-1423.



ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Tarsus'ta doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1988 yılında kaydolduğum Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden 1992 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında açılan sınavı kazanarak Yüksek lisans programına, 1993 yılında ise aynı Bölümde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1996 yılı ocak ayı'nda "Bazı Üzüm Çeşidi ve Anaçlarının Meristem Kültürü Yöntemiyle Çoğaltılması" konulu tezimi tamamlayarak Ziraat Yüksek Mühendisi ünvanını aldım. 1996 yılının Şubat ayında açılan Doktora sınavını kazanarak doktora programına başladım. Halen Bahçe Bitkileri Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

Adana, 2002

Ar. Gör. Serpil GÖK TANGOLAR