

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA BAZI KAYISI
(Prunus armeniaca L.)
ÇEŞİTLERİNDEN ELDE EDİLEN
OLGUN EMBRİYOLARDAN BİTKİ REJENERASYONU

Hilal ERTURAN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2008

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Ahmet EŞİTKEN danışmanlığında, Hilal ERTURAN tarafından hazırlanan bu çalışma 28.08.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Ahmet EŞİTKEN

İmza



Üye : Prof.Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza

: 

Üye : Doç.Dr.Kamil HALILOĞLU

İmza

: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım
(imza)

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda yöneticiliğimi üstlenip bana yön gösteren Sayın Hocam Doç. Dr.Ahmet EŞİTKEN'e (Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Muharrem GÜLERYÜZ'e (Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bölüm Başkanı), Sayın Poç.Dr.Sezai ERCİŞLİ'ye (Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), Sayın Doç. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na (Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi) ve Sayın Dr. H.Ç. KAYMAK'a (Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), tez çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarıma, sevgili aileme, eşim Kadri YILDIZ'a ve ailesine teşekkür ederim.

Hilal ERTURAN
Temmuz, 2008

ÖZET

Y. Lisans Tezi

İN VİTRO KOŞULLARDA BAZI KAYISI (*Prunus armeniaca* L.) ÇEŞİTLERİNİN EMBRİYOLARINDAN BİTKİ REJENERASYONU

Hilal ERTURAN
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet EŞİTKEN

Bu çalışmada bazı kayısı çeşitlerinin (Hasanbey, Kabaası, Soğancı ve Hacıhaliloğlu) olgun embriyolardan bitki rejenerasyonunun sağlanması, bunun sağlanması için kullanılan farklı hormonların etkileri ve farklı çeşitlerin gösterdikleri performansları karşılaştırılmıştır. Birinci kültür ortamında Dikamba, 2,4-D, NAA (4-8 mg/l), BA (0,1mg/l), ikinci kültür ortamında BA, TDZ (2-4 mg/l), 2,4-D (0-0,1 mg/l), Spermin, Putresin (0-0,25 g/l) hormonları kullanılmıştır. Kallus oluşum aşamasında kallus oluşumuna genotiplerin etkisi önemsiz bulunmuş, en iyi kallus oluşumunun 4 2,4-D 0,1 BA uygulamasında (%84,51) olduğu belirlenmiştir. En fazla kahverengileşme Hasanbey çeşidinde (%42,04) ve 4 mg/l 2,4-D+0 mg/l BA uygulamasında (%62,97) meydana gelmiştir. Rejenerasyon ortamında en fazla kahverengileşme Hasanbey çeşidinde (%40,10) ve 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında (%50,51), en yüksek embriyogenik kallus oluşumu 15 gün 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin ortamında bekletilip daha sonra hormonsuz ortama aktarılan (%78,75) uygulamasında tespit edilmiştir. Genotipler arasında ise embriyogenik kallus oluşumu önemsiz olarak saptanmıştır. Rejenerasyon oranı en iyi olan çeşit Hasanbey (%24,84), uygulama ise 15 gün 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin ortamında tutulup hormonsuz ortama aktarılan uygulama (%56,25) olmuştur. En iyi sürgün oluşumunun ise Hasanbey çeşidinde (%22,87) ve 15 gün 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin ortamında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan (%67,50) uygulamasında olduğu belirlenmiştir.

2008, 49

Anahtar Kelimeler: Kayısı, olgun embriyo kültürü, kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

IN VITRO PLANT REGENERATION FROM EMBRİOS OF SOME APRİCOT (*Prunus armeniaca* L.) VARIETİES
Hilal ERTURAN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

In this study, providing plant regeneration of some apricot varieties (Hasanbey, Kabaşı, Soğancı ve Hacıhaliloğlu) from mature embryos, effects of others hormones that used for providing this and performances of other varieties are compared. In first culture medium Dikamba, 2,4-D, NAA (4-8 mg/l), BA (0,1mg/l), in second culture medium BA, TDZ (2-4 mg/l), 2,4-D (0-0,1 mg/l), Spermin, Putresin (0-0,25 mg/l) hormones are used. In first culture medium, effects of genotypes to callus occurring is not important, the best callus occurring is determined in 4 2,4-D 0,1 BA (84,51%) medium. The most brown coloring occurred in Hasanbey variety (42,04%) and 4 2,4-D 0 BA (62,97%) medium. In the second medium, the most brown coloring occurred in Hasanbey variety (40,10%) and 4 TDZ 0 2,4-D Spermin evaluating (50,51%), the highest embryogenical callus occurring is determined in (78,75%) that replaced in hormonless medium after holded in 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Spermin for 15 days. Embryogenical callus occurring between different genotypes established as unimportant. The best regeneration ratio is in Hasanbey variety (24,84%), also the best evaluating is (56,25%) that replaced in hormonless medium after holded in 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Spermin for 15 days. The best shoot occurring is determined in Hasanbey variety (22,87%) and evaluating (67,50%) that replaced in hormonless medium after holded in 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Spermin for 15 days.

2008, 49

Keywords: Apricot, mature embryo culture, callus occurring, plant regeneration

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bitki Materyali	13
3.1.2. Kimyasallar.....	14
3.1.2.a. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar.....	14
3.1.2.b. Kültür ortamında kullanılan kimyasallar.....	14
3.1.2.c. Çalışmada kullanılan rol yapıcı maddeler.....	15
3.1.2.d. Çalışmada kullanılan oksin, sitokinin ve polyamine tipleri.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Sterilizasyon teknikleri	16
3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu.....	16
3.2.1.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu	16
3.2.1.c. Besin ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu	16
3.2.1.d. Sterilizasyonda kullanılan solüsyon hazırlanışı.....	16
3.2.2. Kallus oluşum ortamı	17
3.2.2.1. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı.....	17
3.2.3. Bitki rejenerasyon ortamı	18
3.2.3.1. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı.....	18
3.2.4. Araştırmada incelenen konular.....	18
3.2.5. Verilerin istatistik analizi.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	21
4.1. Kallus oluşum aşamasında farklı uygulamaların etkisi.....	21
4.1.1. Genotipin ve uygulamaların kallus oluşum oranına etkisi (KOO)...	21
4.1.2. Genotipin ve uygulamaların kahverengileşme oranına etkisi(KahO)	23
4.2. Rejenerasyon aşamasında farklı uygulamaların etkisi.....	26
4.2.1. Genotipin ve uygulamaların kahverengileşme oranına etkisi (KahO)	26
4.2.2. Genotipin ve uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi	31
(ESEKO)	
4.2.3. Genotipin ve uygulamaların rejenerasyon ortamına etkisi (RO).....	35
4.2.4. Genotip ve uygulamaların sürgün oluşumuna etkisi.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
5.1. Genotipin kallus sayısı, embriyogenik kallus oluşumu, bitki	43
rejenerasyonu ve sürgün gelişimine etkisi.....	

5.2. Farklı uygulamaların kallus sayısı, embriyogenik kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve sürgün gelişimine etkisi.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
kPa	Kilopaskal
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
SÇKM	Suda çözünür kuru madde miktarı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Farklı uygulamaların kallus oluşumuna etkisi	22
Şekil 4.2	Kültüre alındıktan 15 gün sonra farklı çeşitlerde ve uygulamalarda kahverengileşme durumları	25
Şekil 4.3.	Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında kahverengileşme oranı üzerine etkileri	27
Şekil 4.4.	Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında embriyogenik kallus oluşum oranı üzerine etkileri	32
Şekil 4.5.	Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında rejenerasyon oluşumuna etkileri	36
Şekil 4.6.	Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında sürgün oluşumuna etkileri	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kayısı çeşitleri.....	13
Çizelge 3.2. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	14
Çizelge 3.3. Oksin ve sitokinin stok solisyonlarının hazırlanışı.....	17
Çizelge 4.1. Farklı uygulamaların kayısı çeşitlerinde kallus oluşum oranları üzerine etkileri (%).....	22
Çizelge 4.2. Farklı kayısı çeşitlerinde yapılan uygulamaların kahverengileşme oranlarına (%) etkileri.....	24
Çizelge 4.3. Rejenerasyon kültür ortamında genotip ve uygulamalara göre embriyogenik kallus oluşum oranları (%).....	28
Çizelge 4.4. Rejenerasyon kültür ortamında genotip ve uygulamalara göre kahverengileşme oranlar (%).....	33
Çizelge 4.5. Rejenerasyon kültür ortamında genotip ve uygulamalara göre rejenerasyon oluşum oranları (%).....	37
Çizelge 4.6. Rejenerasyon kültür ortamında genotip ve uygulamalara göre sürgün oluşum oranları (%).....	41

1.GİRİŞ

Türkiye, dünya üzerinde uygun iklim kuşağındaki konumu ve uygun toprak şartları itibariyle bahçe bitkileri yetiştiriciliği açısından birçok ekolojik avantaja sahiptir. Dünyada mevcut gen merkezleri arasında hem Yakındoğu hem de Akdeniz havzası içinde yer alan Türkiye, birçok tür ve çeşidin gen merkezi durumundadır. Öyle ki; bugün dünya üzerinde kültürü yapılan 150'ye yakın meyve türünden yaklaşık 100'e yakını ülkemizde yetiştirilebilmektedir. Anavatanı ülkemiz olmayan ancak uzun yıllardır ülkemizde yetiştirilen ve ülkemizle özdeşleşmiş bazı meyve türleri de vardır. Bu önemli meyve türlerinden biri de kayısıdır (*Prunus armeniaca L.*) (Özbek 1978; Anonim 1995; Anonim 2004).

Yakın veya uzak akraba türler arasında, içinde doğal ve yapay melezlemeler, çeşit ve klonlarda doğal ya da yapay mutasyonlar sonucu ortaya çıkan genetik değişimlerin seleksiyonlar ile değerlendirilmesi meyve ıslahında yüz yıllardır uygulanmaktadır. Bununla birlikte uyumsuzluk, kısırılık, genetik açılım, uzun gençlik kısırlığı periyodu, çoğaltım ve özel kültürel uygulamalar gibi meyve türlerine özgü birçok biyolojik, fizyolojik ve yetiştiricilik sorunları geleneksel yöntemler ile ıslahta süreyi uzatmakta ya da çoğu zaman başarıyı olanaksız kılmaktadır. Buna karşılık özellikle 20. yüzyılın sonlarından itibaren biyoteknoloji alanında kaydedilen hızlı gelişmeler klasik ıslah kapsamında ele alınan bu yöntemlerin etkinliğini artırmanın yanında başarıyı engelleyen sorunlara karşı çözümler sunmaktadır. Böylece meyve türlerinin karakterizasyonu genom analizleri ile yapılabilmekte, kalıtsal yapıları gen aktarımı, somaklonal varyasyon ve somatik hibridizasyon gibi in vitro teknikler ile taksonomik bir sınırlama olmaksızın hızlı ve etkili bir şekilde değiştirilebilmektedir. Bunun yanı sıra hızlı, yoğun ve virüslerden ari çoğaltım, gen kaynaklarının korunması, homozigotinin çok kısa sürede sağlanması, melezlerin embriyo kültürü ile yaşatılması ve birçok etkene karşı genotiplerin reaksiyonlarının kısa sürede test edilmesi sağlanabilmektedir (Litz ve Gray 1992; Schuerman ve Dandekar 1993; Hatipoğlu 1999; Jain 2001; Heslop-Harrison 2005). Biyoteknolojik yöntemlerin en fazla kullanılanlarından biride doku kültürüdür.

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku veya organ (apikal meristem, kök vb) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik farklılıklar (varyabilite) oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd 2002).

Hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olarak sürgün veya kök taslağı diye adlandırılan tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine organogenesis denir (Gürel, 2001). Organogenezde bitki parçalarından ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt) yahutta önce organize olmamış bir hücreler yığını olan kallus ve daha sonra bu kallustan sürgün veya kök (indirekt) meydana gelir. Bitki parçalarından organ gelişimi direk olarak değil de önce “embriyoid” adı verilen embriyo benzeri yapıların daha sonra bu embriyolardan kök ve sürgün gelişiminin meydana gelmesi ise embriyogenesis olarak adlandırılır. Embriyogenesis; bireysel bitkilerin hücrelerinden gelişen somatik embriyogenesis ve döllenmiş bir zigottan gelişen gametik (zigotik) embriyogenesis şeklinde sınıflandırılabilir. Somatik embriyogenesis, bağımsız vasküler sistemi olan ve kök ile sürgün aksini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasına yol açan bir süreçtir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar da somatik embriyo olarak adlandırılır. Bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururlar. Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da “globular”, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum safhalarını geçirirler. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskular bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd 1993).

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından (eksplant) yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir (Babaoğlu vd 2002). Bitki rejenerasyonu kotiledon, embriyo, hipokotil, gövde, yaprak, sürgün ucu, kök, genç tomurcuklar, çiçek taç yapraklar, yumurta dokusu, yumurta hücreleri, yaprak sapı vs. eksplantlardan yapılabilir. Olgun ve olgun olmayan organlardan doğrudan eksplant alınarak rejenerasyon yapılabilir. Eksplant kaynağı olarak son zamanlarda kullanılan endosperm destekli olgun embriyolar daha hızlı kallus oluşumu ve daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olmuştur (Özgen *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1998).

Eksplant kaynakları içinde en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu olgunlaşmamış embriyo kültürlerinde görülmüştür. Ancak, olgunlaşmamış embriyoların elde edilmeleri için bazı koşulların sağlanması gerekmekte ve kullanımı belirli zamanlarla sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle olgun embriyolar kallusların üretimi için uygun eksplant kaynağıdır (Turhan and Baser 2004).

Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibarıyla üç kısımda incelenebilir: 1) Organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon, 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon, 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Birinci tipte uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. İkinci tip rejenerasyon doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonrada bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Son olarak normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir (Babaoğlu vd 2001).

Bitkilerden alınan farklı eksplant kaynaklarından kallus oluşturmada ve rejenerasyonda ortama değişik büyümeyi düzenleyici maddeler ilave edilmektedir. Bu amaçla en fazla

kullanılan maddeler oksin ve sitokinin grubu hormonlardır. Oksin tipi hormonlar köklenmeyi, hücre gelişimini ve kallus oluşumunu teşvik ederler. Sitokininler ise hücre bölünmesini, yeniden farklılaşma ve bitki rejenerasyonunu teşvik ederler. Oksin grubu hormonların doğal olarak bulunan en önemli formu Indol-3-asetik asit (IAA)'dır. Ancak IAA'nın ışık ve sıcaklıkta kararsız olması nedeniyle mikroçoğaltımda sınırlı kullanıma sahiptir. Embriyogenesi teşvik için en fazla kullanılan oksin grubu hormon 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) olmasına rağmen Naftalin asetik asit (NAA), pikloram ve dikamba gibi oksinler ya tek başlarına ya da 2,4 D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Kallus oluşumunu başlatmak için ise sıklıkla 2,4-D tercih edilmektedir. Diğer yandan düşük oksin ve yüksek sitokinin konsantrasyonları sürgün morfogenezini teşvik etmektedir (Thorpe 1981; Özgen 1998). Ayrıca, somatik embriyogenesi uyarmak amacıyla bu hormonların yanı sıra başka maddeler de kullanılmaktadır. Bu maddelerden biri de poliaminlerdir. Poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan organik polivalent katyonlardır (Tabar 1976). Bitki hücre metabolizmasındaki rolleri tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmasına karşın son yıllarda yapılan çalışmalarla poliaminlerin bitki büyüme ve gelişme olaylarında önemli rol oynadığı saptanmıştır (Smith 1985). Doğal olarak meydana gelen poliaminler, hayvan hücrelerinde, aşağı ve yüksek organizasyonlu bütün bitki hücrelerinde bulunmakta ve hormonlardan çok sekonder mesajcı olarak adlandırılmaktadır (Evans 1989). Ancak Bagni (1986), çoğalan hücrelerde hızla sentez edilmeleri ve kolay taşınabilirlikleri nedeniyle, Rosela ve ark. (1993) ise düşük molekül ağırlıkları, geniş kapsamlı etkileri ve organizmada çok yüksek düzeyde bulunmalarından dolayı poliaminlerin daha çok hormonlara benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir. Diğer yandan Galston (1983) içsel poliaminlerin ışık, hormon, polinasyon, stres ve yaşlanma gibi uyarılara verdiği cevapları, taşınımları ve dışsal uygulama sonucundaki etkileri nedeniyle bitkilerde düzenleyici rol oynadığını ifade etmektedir. Poliaminler tek başlarına embriyogenesis (Meijer 1988), kök büyümesi (Jarvis 1985), çiçeklenme (Torrigiani 1987), hücre büyümesi (Kaur-Sawhrey 1980; Palavan 1982), nükleik asit ve protein sentezi (Costa 1983) ve çimlenme gibi pek çok fizyolojik olayda etkili olabilmektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada embriyonik ve embriyonik olmayan kültürlerde poliamin seviyeleri incelenmiş ve Somatik embriyogenez ile bitki rejenerasyonu özelliği olan kültür dokularında poliamin seviyesi

ve putresin-spermidin oranı arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Kaçkar 2007). Ayrıca bir başka çalışmada farklı hormon gruplarının bitki morfolojisine etkileri farklı olmakla birlikte Poliaminler GA₃'ten daha etkili olduğu saptanmıştır (Kireççi 2006).

Ülkemizde farklı bitki türleriyle birçok çalışma yapılmasına rağmen en önemli meyve türlerinden biri olan kayısıda somatik embriyogenesis ile ilgili pek çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca daha önceleri kayısıda eksplant kaynağı olarak olgun embriyolar pek kullanılmamıştır. Bundan dolayı çalışmada, ülkemizin en önemli meyve türlerinden birisi olan kayısı (*Prunus armeniaca* L.)'da Hasanbey, Kabaası, Soğancı ve Hacıhaliloğlu çeşitlerinde olgun embriyodan bitki rejenerasyonunun sağlanması, bunun sağlanması için kullanılan farklı hormonların (NAA, 2,4-D, BA, Dikamba, Putresin, Spermin) etkilerinin ve farklı çeşitlerin kallus oluşumu, embriyogenik kallus oluşumu, rejenerasyon ve sürgün oluşumu performanslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki doku kültürü, bitkilerin çeşitli kısımlarından alınan hücre, doku ve organların sterilize edildikten sonra çeşitli besin maddeleri içeren steril ortamlarda ve uygun çevre koşullarında kültüre alınması ve büyütülmesi işlemidir (Gönülşen 1987). Pratikte kullanımına 1960'lı yıllardan başlanan doku kültürü tekniklerinde, günümüze kadar hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Bu tekniklerde hücre, doku, embriyo ve farklı organlardan alınan eksplantlardan steril koşullar altında ve özel besin ortamlarında yeni kültürlerin üretilmesi amaçlanmıştır (Öksüz 1993). Günümüzde bu teknikler, gen mühendisliği ve biyoteknolojik çalışmalar ile kombine edilerek çok amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Chawla and Wenzel (1987), arpada sürgün rejenerasyonunun hormonsuz ortamda ya da 2,4-D'nin düşük konsantrasyonlarında IAA ve BAP içeren ortamlardan daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Royal kayısı çeşidinin olgun olmayan embriyoları (25–100 PF index) in vitro şartlarda bitki rejenerasyonu eldesi için kullanılmıştır. Çalışmada birinci durumda kallus 4.5 μM 2,4 D'ye ilave olarak 0.44 μM BA içeren MS ortamında elde edilmiş ve kalluslardan bitki rejenerasyonu 4.4 μM BA'ya ilave olarak 1.0 μM 2,4 D içeren MS ortamında meydana gelmiştir. İkinci durumda genç tomurcuklar 4.4 μM BA'ya ilave olarak 1.0 μM 2,4 D içeren MS ortamında kotiledonlardan doğrudan rejenere edilmiştir (Pieterse 1989).

Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipler arasındaki farklılığın içsel (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

Berrios *et al.* (1999), ayçiçeğinde organogenesis yoluyla in vitro rejenerasyon üzerine phytagar (3 g/l), phytagel (3 g/l), agarose (5 g/l), arcagel (4 g/l) ve agar-agar (7 g/l) jel

yapıcı maddelerin etkisini araştırmışlardır. Sürgün oluşumu için agarose ve agar-agar'ın diğer jel yapıcı maddelerden daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Li *et al.* (2003), yüzey sterilizasyonu yaptıkları tohumları 25+/- 1°C'de ½ MB (B5 vitamini + 2 mg/l glycine, 300 mg/l glutamin+500 mg/l casein hydrosate + %3 sakkaroz + %0,7 agar +MS tuzları) ortamında 20-24 saat çimlendirdikten sonra aseptik koşullarda çıkardıkları buğday embriyolarını, olgunlaşmamış embriyolar için kullandıkları 2 mg/l 2,4-D içeren MB ortamında kültüre almışlardır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için Thidiazuron (TDZ) içeren MB ortamına aktarmışlardır. Bitki rejenerasyonu için TDZ'nin 1 mg/l dozunun uygun değer olduğunu bildirmişlerdir.

Dört farklı badem çeşidinin (Ne Plus Ultra; Non Pareil, Carmel, Parkinson) olgun olmayan kotiledonlarından genç sürgünler rejenere edilmiştir. Açık tozlanmış meyveler tam çiçeklenmeden 100-115 gün sonra bahçeden toplanmıştır. Kotiledonların bitim noktaları kesilip çıkarılmıştır. TDZ ve IBA'nın farklı konsantrasyonları ve kültürün ilk bir haftasında ışıklı ve ışısız ortamların etkisi belirlenmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı bitki büyümesini düzenleyicilerin bulunmadığı dört haftalık süreyi takiben, TDZ (10.0 µM) içeren MS alt kültüründe 8 hafta için kültüre alınan kotiledonlarda en yüksek olmuştur. Kotiledonlar 7 gün için karanlıkta tutulmasıyla rejenerasyon seviyesi çok daha fazla olmuştur. IBA (0.5 µM) önemli oranda genç sürgünlerin gelişimini azaltmıştır (Ainsley *et al.* 2004).

Adi diş budak bitkisinin 3 farklı (K-59, N-5, T-3) tipinin olgun embriyoların in vitro şartlarda MS ortamında kültüre alındığı çalışmada her 10 günde morfogenez gözlemlenmiş ve T-3 tipi aynı kültür şartları altında en yüksek morfogenez göstermiş ve 20 gün içinde organlar oluşmuştur (Mockeliunaite and Kuusiene 2004).

Scirpus acutus (Hasırotu) bitkisine in vitro şartlarda embriyo kültürü yapılmıştır. İzole edilmiş embriyolar kültüre alındığında %85,6'lık maksimum bir çimlenme göstermiştir (Lauzer 2004).

Zapada *et al.* (2004), arpada olgun embriyo kültüründe MS, N6, SH ve J 25-8 ortamlarını kullanmışlardır. En fazla kallus oluşumu %75,5 ile 2 mg/l 2,4-D içeren J 25-8 ortamından elde edilirken, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında bu değer %35'e düşmüştür.

İn vitro şartlarda kültür gereksinimlerini belirlemek, olgunlaşma, çimlenme ve in vitro şartlarda çimlenmeleri için embriyo yaşlarını belirlemek amacıyla erkenci subtropikal şeftali çeşidinde altı yaşlı embriyo alınmıştır. Çalışmanın sonucunda tam karanlık ortam, MS (mikro + organik bileşikler) +B5 (makro) kültür ortamıyla birlikte Casein hydrolate (200 mg/l) + L-glutamin (200 mg/l), sakkaroz (40 mg/l) ve BAP (2 mg/l)+IAA (0.5 mg/l) olgunlaşma için daha iyi etkiye sahip olmuşlardır. Çimlenme B5+MS kültür ortamıyla birlikte sakkaroz (30 mg/l) ve BAP (15 mg/l)+GA₃ (1 mg/l) ve 12 saat gece 12 saat gündüz ortamı embriyolar için daha iyi olmuştur (Srivastav *et al.* 2005).

Tilia patyphyllos (Büyük Yapraklı İhlamur)'un olgun tohumlarından izole edilen embriyoların farklı şeker, BAP, kinetin dozlarının eklendiği MS ortamında kültüre alınmış ve bu ortamların in vitro koşullarda embriyo gelişimi, bitkicik oluşumu ve tomurcuk oluşumuna olan etkileri araştırılmıştır. Araştırmada sonuç olarak, olgun ıhlamur tohumu embriyolarının şekerli ortamlarda çimlendirilerek bitki elde edilebileceği ve buradan elde edilen bitki epikotillerinin kültüre alınmasıyla, tomurcukların çoğaltılabileceği gösterilmiştir (Üçler ve Mollamehmetoğlu 2001).

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü biyoteknoloji laboratuvarında 1998-99 yıllarında yulafta kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 10 yulaf çeşit yada hattı kullanılmıştır. Kallus oluşturmada olgun embriyolardan yararlanılmış. Elde edilen veriler sonucunda; kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin çeşit ve hatlara göre değiştiği, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişkinin olmadığı, rejenere bitki sayısının doğrudan kallus oluşumuna bağlı olduğu saptanmıştır (Birsin vd 2001).

Kışlık buğdayın (*Triticum aestivum*) 12 farklı genotiplerinin olgun embriyolarından kallus eldesi ve bitki rejenerasyonu amaçlandığı bir çalışmada aseptik şartlarda olgun olmayan embriyolar 2mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra olgun embriyolar 8mg/l 2,4 -D ortamına kallus oluşturmak amacıyla konulmuşlardır. Gelişen kallus ve rejenerasyonla elde edilmiş bitkiler 2,4-D olmayan MS ortamına alınmışlardır. Çalışmada elde edilen bitkiler haploid kromozom sayısına sahip olmuşlardır. Kallus oluşma oranı, kallusun rejenerasyon kapasitesi ve rejenerasyonla elde edilmiş bitki sayıları birbirinden bağımsız olmuştur. Olgun embriyolar büyük oranda kallus oluşturma ve rejenerasyon kapasitesine sahip olmuşlardır (Özgen 1998).

Erzincan ilinden temin edilen hasanbey kayısı çeşidiyle yapılan bir çalışmada embriyolar 0,0; 0,1; 1,0 ve 2,0 mg/l NAA içeren MS ortamında tam çiçeklenmeden 30 gün sonra 15'er gün aralıklarla kültüre alınmışlardır. 30. günde alınan embriyolar hormonsuz MS ortamında %11,11 oranında çimlenmişlerdir. Tam çimlenme 1,0+0,0; 1,0+0,1; 2,0+0,0 ve 2,0+0,1 mg BA+NAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Sonraki dönemlerde hormonsuz ortamda çimlenme oranında artış saptanırken hormon içeren ortamda azalma meydana gelmiştir. 90. günde hormon içermeyen ortamda %89,89'luk bir çimlenme oranı belirlenmiş, buna karşı 2,0+0,1 mg/l BA+NAA içeren hormon ortamında ancak %22,22'lik bir oran elde edilmiştir. Çalışmada sonuçlar hormon ve embriyoların olgunluk aşamalarının önemli olduğunu göstermiştir (Eşitken vd 1997).

100 mg/l hidrolize-kazein, 100 mg/l askorbik asit ve BAP ile desteklenmiş sıvı MS besi ortamında kültüre alınmış olan *Pistacia atlantica* (Atlantik Sakızı)'nın tohumlarından embriyogenik doku rejenere edilmiştir. Embriyogenik dokular sıvı besi ortamında BAP(0.5–4 mg/l) kültüre alındıktan 3 hafta sonra tohum eksplantlarından direkt olarak farklılaşmıştır. Rejenere olan dokular BAP ile aynı besi ortamında birkaç kez alt kültürü yapıldıktan sonra somatik embriyolar üretilmiştir. Olgunlaşmamış somatik embriyolar olgunlaşma için agarla katılaştırılmış MS besi ortamına transfer edilmiş, olgunlaşmış somatik embriyolar ise bitki büyüme düzenleyicisi olmayan besi ortamında çimlendirilerek fideler elde edilmiştir (Onay 1998).

Verime yatmış melez fındık (*Corylus avellana* L.) bitkileriyle yapılan bir çalışmada dormant çeliklerin sürmesi ile meydana gelen taze sürgünlerden alınan gözler 6.7 μ M, 11.1 μ M veya 15.5 μ M N-6 benziladenin (BA) ile poliaminler (0.2 mM putresin+0.2 mM spermidin+0.05 mM spermin) içeren veya içermeyen Murashige ve Skoog [MS (1962)] ortamı ve modifiye Driver ve Kuniyuki [DKW (1984)] ortamı üzerine kültüre alınmıştır. Kültür ortamı ile BA'nın eksplant reaksiyonları üzerine olan etkileri önemsiz bulunmuştur. Ortama ilave edildiklerinde, poliaminlerin sürgün uzunluğunu %83 ve sürgün başına tomurcuk sayısını %41 oranında artırma sonucu çok etkili oldukları gözlenmiştir. Poliamin içeren ortam üzerindeki bazı sürgünlerin 4.0 cm'ye kadar, poliamin içermeyen ortam üzerindeki sürgünlerin ise en fazla 2.0 cm'ye kadar büyüebildikleri gözlenmiştir. Bulgular, ortama ilave edildiklerinde poliaminlerin eksplantların kültüre alınmalarını kolaylaştırabileceğini ve morfojenik kapasitelerini artırabileceğini göstermiştir (Nas 2003).

Yapılan bir çalışmada bazı ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) genotiplerinde yaprak disklerinden in vitro sürgün organogenesi uyarılmıştır. Organogenesis için iki denemede TDZ+NAA kombinasyonları ya da BA+NAA, AgNO₃ ve putresin uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Sürgün organogenesi sadece 0.33 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA+2.0 mg/l AgNO₃ içeren MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamında önemli düzeyde uyarılmıştır (Aygün 2006).

Lasirus scindicus, *Sorghum halepense* ve *Urochloa panicoides* için potansiyel explant kaynağı olarak genç çiçeklerin bazal kısımları kullanılarak bitki rejenerasyonu için doku kültürü metotları geliştirilmiştir. Embriyonik ve embriyonik olmayan kültürlerde poliamin seviyeleri incelenmiştir. Somatik embriyogenez ile bitki rejenerasyonu özelliği olan kültür dokularında poliamin seviyesi ve putresin-spermidin oranı arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Kaçkar 2007).

Yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 6 farklı burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenleri değişik

oranlarda TDZ içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında kültüre alınmıştır. Thidiazuron (TDZ) konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan eksplantların sürgün rejenerasyonuna etkisi geniş bir varyasyon göstermiştir. En yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı %90 ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı da 22 adet olarak belirlenmiştir (Erdoğan 2004).

Yapılan bir çalışmada armut (*Pyrus communis* L. cu “Ankara”), ayva (*Cydonia oblonga* Mill. Cu “ekmek”), elma (*Malus x domestica* Barkh. Cv “Gloster”), erik (*Prunus domestica* L. cu “Stanley”), kayısı (*Prunus armeniaca* L. cu “şekerpare”), vişne (*Prunus cerasus* L. cu “Kütahya”), kiraz (*Prunus avium* L. cu “Dalbastı”), ceviz (*Juglans regia* L. “Kaman”), fındık (*Corylus avellana* L. cu “Tombul”) ve limonda (*Citrus limon* (L.) Burm. Cu “Kara limon”) dişi organ dokularından stigma, stil ve ovaryumdan somatik embriyo ve kallus oluşum oranları üzerine 1, 3, 5 mg/l benziladenin (BA) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (2,4-D) etkileri incelenmiştir. İki yıl yapılan çalışmalar sonucunda erik dışındaki tüm türlerde özellikle 2,4-D uygulamalarında kallus oluşumları meydana gelmiştir. Somatik embriyo oluşumu, sadece limonda 5 mg/l BA uygulamasında ovaryumdan %21 ve stilden %23,5 oranlarında belirlenmiştir (Gürçan 2003)

Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle adventif sürgün rejenerasyonunun geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, altı kolza çeşidine ait hipokotil ve gövde eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin 6-benzylaminopurine (BAP), α -Naphthaleneacetic acid (NAA), Thidiazuron (TDZ)) kombinasyon halinde bulunduğu MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek sürgün rejenerasyon oluşturan çeşit %90 oranında 3 mg/l BAP+0,2 mg/l NAA kombinasyonunu içeren MS ortamı Spok olarak tespit edilmiştir (Darçın 2003).

Yapılan bir çalışmada haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin tohumları MS besi ortamında çimlendirilmiştir. Bu ortamda yetişen bitkilerin hipokotil eksplantlarından 1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında kallus kültürleri elde edilmiştir. Bu kallusların

hormonsuz besi ortamına aktarılmasıyla somatik embriyogenez ortaya çıkmıştır. Aynı ortamda alt kültüre alınmaya devam edilen embriyolardan ileri dönemde rejenere sürgünler gelişerek tam bir bitkiciğe dönüşmüşlerdir (Oluk 2005).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada materyal olarak Malatya'dan temin edilen Hacıhaliloğlu, Kabaası, Hasanbey, Soğancı kayısı (*Prunus armeniaca*) çeşitlerinin olgun embriyoları kullanılmış ve çeşitlerle ilgili bilgiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kayısı çeşitleri

Çeşit	Özellikleri	Temin Edilen Yer
HACIHALİLOĞLU	Malatya'nın en önemli kurutmalık kayısı çeşididir. Meyveleri orta irilikte, 25-30g ağırlıkta, meyve şekli oval, simetrik, meyve kabuk ve et rengi sarı, sert dokulu ve kırmızı yanak oluşturma eğilimindedir. Meyve az sulu, çok tatlı, aromalı, SÇKM'si yüksektir.	Malatya Merkez Araştırma Enstitüsü
KABAAŞI	Son yıllarda Malatya ve çevresinde geniş miktarda yetiştirilmeye başlanmıştır. Meyveleri orta irilikte, 30-35g ağırlığında, meyve oval şekilli ve et rengi sarıdır. Meyve tatlı, SÇKM % 24-26, meyve eti sert dokuludur. Kurutmalık bir çeşittir.	Malatya Merkez Araştırma Enstitüsü
HASANBEY	Malatya'nın önemli kayısı çeşitlerinden biridir. Meyve kalp şeklinde, iri, 40-45g ağırlığında, meyve eti sert dokulu ve tatlıdır. SÇKM % 18-22, meyve kabuk ve et rengi sarıdır. Genelde sofralık olarak değerlendirilir.	Malatya Merkez Araştırma Enstitüsü
SOĞANCI	Meyveleri 28-38g ağırlığında, yuvarlak şekilli, meyve kabuk ve et rengi sarıdır. Meyvesi tatlı, SÇKM' si % 23-26, meyve eti sert dokuludur. Kurutmalık bir çeşittir.	Malatya Merkez Araştırma Enstitüsü

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.a. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar

- % 70'lik etil alkol
- % 15'lik sodyum hipoklorit

3.1.2.b. Kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar

Kallus, embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında Murashige ve Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524] ve vitaminleri [Sigma M3900] kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktar(mg/l)
İNORGANİKLER	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2 H ₂ O	332,2
MgSO ₄ .7 H ₂ O	180,7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA	37,26
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
ORGANİKLER	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

3.1.2.c. Çalışmada kullanılan jel yapıcı maddeler

Çalışmada kallus oluşum ortamında ve bitki rejenerasyonu ortamında jel yapıcı madde olarak agar (7 g/l) kullanılmıştır.

3.1.2.d. Çalışmada kullanılan oksin, sitokinin ve polyamine tipleri

- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- 3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dikamba)
- NAA (naftalin asetik asit)
- 6-Benzil amino pürin (BAP)
- TDZ (Thidiazuron)
- Putresin (Polyamin)
- Spermin (Polyamin)

3.2. Yöntem

Bu çalışmada, 4 kayısı çeşidinin (Hacıhaliloğlu, Hasanbey, Soğancı ve Kabaaşı) olgun embriyoları kallus oluşumu için agar (7 g/l) içeren MS ortamında 3 farklı oksin tipinin (2,4-D, Dikamba ve NAA) 3 farklı dozu (0,0, 4,0 mg/l ve 8,0 mg/l) ile BA'nın 2 dozu (0,0, 0,1 mg/l) kombinasyon halinde 3 tekerür olarak denemeye alınmıştır. Olgun embriyolar $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 4 hafta süreyle bekletilmiştir. Bitki rejenerasyonu için meydana gelen kalluslar 2 farklı sitokinin tipinin (BA ve TDZ) 2 değişik miktarında (2,0 mg/l ve 4,0 mg/l), oksin tipinin (2,4-D) 2 farklı miktarı (0,0 ve 0,1 mg/l) ve 2 farklı polyamine tipinin (putresin ve spermin) 2 farklı miktarı (0,0 ve 0,25 mg/l) kombinasyon halinde 2 tekerürlü olarak MS ortamına aktarılmıştır. 15 gün sonra tekrar aynı ortam hazırlanarak oluşan kallusların yarısı bu ortama yarısı da hormonsuz ortama aktarılmış ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 8:16 saat karanlık: ışık fotoperyotta bekletilmiştir. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası ve yoğunluğu olarak 1500 luks kullanılmıştır. Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında aşağıdaki şu işlemler uygulanmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon teknikleri

3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan aletler (bisturi, pens v.b.) etüvde (150⁰C, 2 saat) steril edilmiştir. Steril kabin içi çalışmadan önce %70'lik etil alkolle silinmiş ve UV lambası açılmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Eksplantların kesimi alüminyum folyo içine sarılarak etüv edilmiş 10x15 cm boyutlarındaki kurutma kağıtlarına sarılmış fayans üzerinde yapılmıştır. Kabin içine alınan aletler (bisturi, pens) tohumların her kesiminden önce sterilizatörle steril edilmiştir.

3.2.1.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde %70'lik etil alkolde 3 dakika, %30'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde de 15 dakika karıştırılarak bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar steril saf suyla 3 kez yıkandıktan sonra bir gece steril su içerisinde bekletilmiş ve daha sonra olgun embriyolar çıkarılmıştır.

3.2.1.c. Besin Ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu

Besin ortamları otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C'de steril edilmiştir. Sıcakta bozulan vitamin ve bitki büyüme düzenleyicileri 0,22 µm poroziteli selüloz filtreler (milipor) yardımıyla sterilize edilmiş ve gıda ortamına otoklavdan çıkarıldıktan sonra ilave edilmiştir.

3.2.1.d. Sterilizasyonda kullanılan çözeltilerinin hazırlanışı

%70'lik Etil alkolün hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 365 ml alınmış ve hacim 500 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır.

%1.5'lik Sodyum hipoklorit çözeltisinin hazırlanışı: %5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari *Domestos®* marka çamaşır suyundan 150 ml alınarak hacim 500 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır.

3.2.2. Kallus oluşum ortamı

Oksin ve sitokinin stok çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ve saklama sıcaklıkları ile çalışma konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Oksin ve sitokinin stok çözeltilerinin hazırlanışı

Oksin tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
2,4-D	etil alkol	su	+5 ⁰ C	4/8 mg/l
Dikamba	su/etil alkol	su	+5 ⁰ C	4/8 mg/l
NAA	etil alkol	su	+5 ⁰ C	4/8 mg/l
Sitokinin tipi				
BA	Baz	su	+5 ⁰ C	0/0,5/0,1 mg/l

3.2.2.1. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 1 litrelik bir behere 500 ml bidistile su konulmuştur.
2. Murashige and Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524], 30 g sakkaroz tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Dereceli silindirde hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.
4. Beherdeki karışım tamamen çözülünce manyetik karıştırıcı üzerinde 1 N NaOH ve HCl solüsyonları kullanılarak pH 5,7' ye ayarlanmıştır.

5. 7 g agarla karıştırılan çözelti otoklavda 15 dk boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C' de sterilizasyona tabi tutulmuştur.

6. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 1 lt'lik MS vitamin solüsyonundan (1000X) 1 ml kullanılmıştır.

7. Bitki büyüme düzenleyicileri (2,4-D, BA, NAA, Dikamba) milipordan geçirilerek sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte 4 mg/l-8 mg/l (2,4-D), 0-0,1 mg/l (BA), 4 mg/l-8 mg/l (NAA), 4 mg/l-8mg/l (Dikamba) oranlarında eklenmiştir.

3.2.3. Bitki rejenerasyon ortamı

Bitki rejenerasyon ortamı için ortamda kullanılan BA, 2,4-D, TDZ, Spermin ve Putresin bitki büyüme düzenleyicilerinin stok çözeltileri hazırlanmıştır. BA ve TDZ stok çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak NaOH, 2,4-D için ise etil alkol ve seyreltici olarak ta su kullanılmıştır. Spermin ve Putresin çözeltileri hazırlanırken herhangi bir çözücü kullanılmamıştır.

3.2.3.1. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 1 litrelik bir behere 500 ml bidistile su konulmuştur.
2. Murashige and Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524], 30 g sakkaroz tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Dereceli silindirde hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
4. Beherdeki karışım tamamen çözülünce manyetik karıştırıcı üzerinde 1 N NaOH ve HCl solüsyonları kullanılarak pH 5,7'ye ayarlanmıştır.
5. Çözelti 200 ml'lik erlenlere aktarılıp her biri 1,4 g agarla karıştırılarak otoklavda 15 dk boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C' de sterilizasyona tabi tutulmuştur.
6. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. 200 ml'lik erlenlere 200µl vitamin eklenmiştir.

7. Bitki büyüme düzenleyicileri (BA, 2,4-D, TDZ, Putresin ve Spermin) milipordan geçirilerek sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte 2 mg/l-4 mg/l (BA), 0-0,1 mg/l (2,4-D), 2 mg/l-4 mg/l (TDZ), 0-0,25 mg/l (Putresin ve Spermin) oranlarında farklı kombinasyonlar halinde eklenmiştir.
8. 15 gün sonra aynı ortamdan tekrar hazırlanarak elde edilen kallusların yarısı bu ortamlara yarısı da hormonsuz ortamlara aktarılmıştır.

3.2.4. Araştırmada incelenen konular

1. Kallus oluşum oranı (KOO) (%): Eksplantlar kallus oluşum ortamına alındıktan 30 gün sonra şu formüle göre belirlenmiştir.

$$KOO (\%) = \text{Oluşan kallus sayısı} / \text{kültüre alınan eksplant sayısı} \times 100$$

2. Kahverengileşme oranı (KahO) (%): Eksplant sayısına göre hesaplanmıştır.

$$KahO (\%) = \text{Kahverengileşen kallus sayısı} / \text{eksplant sayısı} \times 100$$

3. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO) (%):

$$ESEKO = \text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{eksplant sayısı} \times 100$$

4. Rejenerasyon oluşumu (RO) (%): Yeşil noktalara sahip kalluslara göre belirlenmiştir.

$$RO = \text{Rejenere kallus sayısı} / \text{kallus sayısı} \times 100$$

5. Sürgün oluşumu (SO) (%): Meydana gelen sürgün sayısına göre belirlenmiştir.

$$SO = \text{Sürgün sayısı} / \text{kallus sayısı} \times 100$$

3.2.5. Verilerin istatistik analizi

Bu araştırmada doku kültüründe çeşitlerin (Hacıhaliloğlu, Kabaaşı, Hasanbey, Soğancı), farklı bitki büyüme dzenleyilerinin (2,4-D, NAA, BA, Dikamba, TDZ, Pikloram, Spermin) etkileri araştırılmış ve kallus oluşum oranı, kahverengileşme, embriyogenik kallus oluşumu, rejenerasyon oluşumu, sürgün oluşumuna ilişkin hesaplamalar ilk ortamda 13x4x3, ikinci ortamda ise 24x4x2 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planı uygulanmıştır. Tüm konulara ait önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklar Duncan oklu karşılaştırma testi ile ifade edilmiştir (SAS 1982). Ayrıca, istatistik analizinden önce elde edilen değerlere (kallus oluşumu, kahverengileşme, embriyogenik kallus oluşumu, rejenerasyon ve sürgün oluşumu) arcsin transformasyonu yapılmıştır (Düzgüneş vd. 1993).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada kayısıda olgun embriyolar kullanılarak, doku kültürü ortamında çeşidin (Hacıhaliloğlu, Kabaası, Hasanbey, Soğancı) ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, NAA, BA, Dikamba, TDZ, Putresin, Spermin), kallus oluşum oranı (KOO), kahverengileşme oranı (KahO), eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO), rejenerasyon oluşumu (RO) ve sürgün oluşumu (SO) üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.1. Kallus oluşum aşamasında farklı Uygulamaların Etkisi

4.1.1. Çeşitlerin ve uygulamaların kallus oluşum oranına (KOO) etkisi

Farklı dozlarda hormon ilave edilen besi ortamına yerleştirilen olgun embriyolarda kallus oluşum oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar önemsiz olarak bulunmuştur. Uygulamalar arasındaki farklılıklar ise çok önemli olarak saptanmıştır ($P<0.01$). En yüksek kallus oluşumu %84,51 ile 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA uygulamasında tespit edilirken, kontrolde hiç kallus meydana gelmemiştir, hormon uygulamaları içinde en düşük kallus oluşumu ise %47,02 ile 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamasında belirlenmiş ve kontrol ile hormon uygulamaları arasında istatistiki olarak önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1.'de de görüldüğü gibi NAA ve Dikamba'nın yüksek, 2,4-D'nin düşük dozları kallus oluşumu üzerine daha olumlu etkilere sahiptir. BA ile kombinasyonlarda ise genel itibarıyla BA'nın katılımı kallus oluşumunu teşvik etmiştir. BA'nın Dikambayla kombinasyonunda düşük dozları, 2,4-D ile kombinasyonunda ise yüksek dozları etkili olmuştur. NAA ile kombinasyonunda ise NAA'nın düşük dozunda yüksek dozlu BA, NAA'nın yüksek dozunda ise düşük dozlu BA etkili olmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı uygulamaların kayısı çeşitlerinde kallus oluşum oranları üzerine etkileri (%)

Çeşit					
Uygulama	Kabaaşı	Soğançı	H.Haliloğlu	Hasanbey	Ortalama
Kontrol	0,00 d**	0,00 c**	0,00e**	0,00e**	0,00e**
4mg/l Dikamba+0 mg/l BA	60,00abc	60,00ab	90,00a	47,31bc	64,33bc
4mg/l Dikamba+0,1mg/l BA	51,15abc	38,85b	68,07abc	30,00cd	47,02d
8mg/l Dikamba+0 mg/l BA	64,23abc	90,00a	81,14ab	76,92ab	78,07abc
8mg/l Dikamba+0,1mg/l BA	51,15abc	90,00a	60,00abc	81,14ab	70,57abc
4mg/l 2,4 D+0mg/l BA	81,14ab	63,44ab	90,00a	55,37abc	72,49abc
4mg/l 2,4 D+0,1mg/l BA	90,00a	68,07ab	90,00a	90,00a	84,51a
8mg/l 2,4 D+0 mg/l BA	34,23cd	81,14ab	42,70c	90,00a	62,01cd
8mg/l 2,4 D+0,1mg/l BA	90,00a	68,07ab	81,14ab	90,00a	82,30ab
4mg/l NAA+0 mg/l BA	43,09bc	60,00ab	51,15bc	90,00a	61,06cd
4mg/l NAA+ 0,1mg/l BA	55,37abc	90,00a	90,00a	54,99abc	72,59abc
8mg/l NAA+0 mg/l BA	90,00a	81,14ab	47,31c	81,14ab	74,90abc
8mg/l NAA+0,1mg/l BA	54,99abc	76,92ab	90,00a	76,92ab	74,71abc
Ortalama	58,87 ^{ÖD}	66,44	66,74	67,81	

** : p<0,01 çok önemli ÖD: önemsiz



(a)



(b)

Şekil 4.1 Farklı uygulamaların kallus oluşumuna etkisi

(a) 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, (b) 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA

Kallus oluşum oranları açısından çeşitler tek tek incelendiğinde bütün çeşitlerde uygulamalar arasındaki farklılıklar çok önemli olarak belirlenmiştir (p<0,01). Kabaaşı çeşidinde en yüksek kallus oluşumu %90,00 ile 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, 8 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA ve 8 mg/l NAA+0,0 mg/l BA uygulamalarında olurken kontrol

uygulamasında kallus oluşumu hiç saptanamamıştır. En düşük kallus oluşumu ise %34,23 ile 8 mg/l 2,4-D+0,0 mg/l BA uygulamasında olmuştur. Çizelge 4.1.'de de görüldüğü gibi Kabaası çeşidinde Dikamba ve NAA'nın yüksek, 2,4-D'nin düşük dozları kallus oluşumunda etkili olmuştur. Soğancı çeşidinde ise en yüksek kallus oluşum %90,00 ile 8 mg/l Dikamba+0,0 mg/l BA, 8 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA ve 4 mg/l NAA+0,1 mg/l BA uygulamalarında, en düşük ise %38,85 ile 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamasında bulunmuştur. Çizelge 4.1.'den görüldüğü gibi Soğancı çeşidinde Dikamba, NAA ve 2,4-D'nin yüksek dozları kallus oluşumunda etkili olmuştur. Hacıhaliloğlu çeşidinde en yüksek kallus oluşum oranı %90,00 ile 4 mg/l Dikamba+0,0 mg/l BA, 4 mg/l 2,4-D+0,0 mg/l BA, 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, 4 mg/l NAA+0,1 mg/l BA ve 8 mg/l NAA+0,1 mg/l BA uygulamalarında, en düşük kallus oluşumu ise %42,70 ile 8 mg/l 2,4-D+0 mg/l BA uygulamasında tespit edilmiştir. Hacıhaliloğlu çeşidinde çizelge 4.1.'den de görüldüğü gibi kallus oluşumunda Dikamba, 2,4-D ve NAA'nın düşük dozları etkili olmuştur. Hasanbey çeşidinde ise en yüksek oluşum %90,00 ile 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, 8 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, 8 mg/l 2,4-D+0 mg/l BA ve 4 mg/l NAA+0 mg/l BA uygulamalarında, en düşük ise %30,00 ile 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamasında belirlenmiştir. Hasanbey çeşidinde Dikamba ve 2,4-D'nin yüksek dozları, NAA'nın ise hem düşük hem de yüksek dozları kallus oluşumunda etkili olmuştur. Kabaası çeşidinde olduğu gibi soğancı, Hacıhaliloğlu ve Hasanbey çeşitlerinde de kontrol uygulamalarında hiç kallus oluşumu tespit edilmemiştir (Çizelge 4.2).

4.1.2. Çeşitlerin ve uygulamaların kahverengileşme oranına (KahO) etkisi

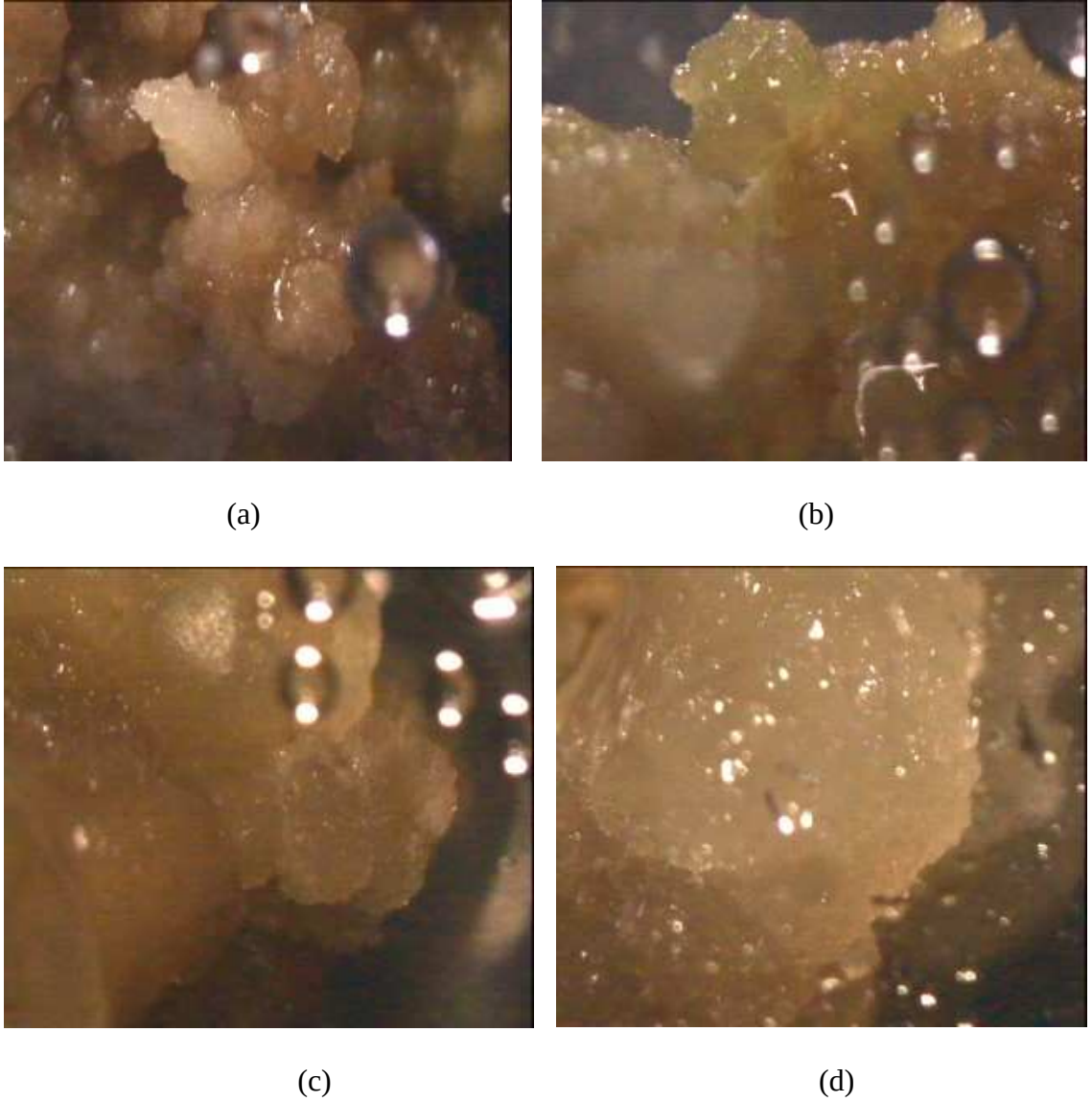
Kahverengileşme oranları açısından çeşitler arası farklılıklar çok önemli olarak bulunmuştur. En çok kahverengileşme %42,04 ile Hasanbey çeşidinde, en az da %26,51 ile Soğancı çeşidinde saptanmıştır (Şekil 4.1). Yapılan büyümeyi düzenleyici madde uygulamalarının da kahverengileşme oranına etkileri çok önemli bulunmuştur. En yüksek kahverengileşme %62,97 ile 4 mg/l 2,4 D+0,0 mg/l BA uygulamasında, en düşük ise %13,18 ile 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamasında meydana gelmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1). Çizelge 4.1.'de de görüldüğü gibi kahverengileşme üzerine

yapılan uygulamalardan Dikamba ve NAA'nın yüksek, 2,4-D'nin düşük dozları kahverengileşme oranını artırmıştır. BA ile kombinasyonlarında ise BA'sız olan uygulamalarda kahverengileşme daha fazla olmuştur. Ayrıca NAA ilaveli olan uygulamalar diğer uygulamalara göre daha düşük oranlarda kahverengileşme göstermiştir.

Çizelge 4.2. Farklı kayısı çeşitlerinde yapılan uygulamaların kahverengileşme oranlarına (%) etkileri

Çeşit					
Uygulama	Kabaaşı	Soğancı	H.Haliloğlu	Hasanbey	Ortalama
Kontrol	21,93 ab**	21,93b-e**	35,02b-e**	0,00b**	19,72cde**
4mg/l Dikamba+0 mg/l BA	21,93ab	46,93abc	21,93cde	51,14ab	35,48bcd
4mg/l Dikamba+0,1mg/l BA	21,93ab	21,93b-e	8,85de	0,00b	13,18e
8mg/l Dikamba+0mg/l BA	35,02ab	46,93abc	30,00b-e	38,07ab	37,50bc
8mg/l Dikamba+0,1mg/l BA	26,56ab	35,02a-d	26,16cde	38,86ab	31,65b-e
4mg/l 2,4 D+0mg/l BA	51,15a	55,37a	72,29a	73,08a	62,97a
4mg/l 2,4 D+0,1mg/l BA	38,86ab	50,77ab	46,93abc	38,07ab	43,65b
8mg/l 2,4 D+0mg/l BA	34,23ab	0,00e	63,44ab	72,29a	42,49b
8mg/l 2,4 D+0,1mg/l BA	43,09a	0,00e	42,70a-d	81,14a	41,73b
4mg/l NAA+0mg/l BA	21,93ab	0,00e	39,25a-d	46,92ab	27,02b-e
4mg/l NAA+0,1mg/l BA	8,85b	17,70cde	0,00e	33,84ab	15,10de
8mg/l NAA+0mg/l BA	30,79ab	13,08de	34,63b-e	43,09ab	30,39b-e
8mg/l NAA+0,1mg/l BA	8,85b	35,02a-d	35,02b-e	30,00ab	27,22b-e
Ortalama	28,08b**	26,51b	35,09ab	42,04a	

** : p<0,01 çok önemli



Şekil 4.2 Kültüre alındıktan 15 gün sonra farklı çeşitlerde ve uygulamalarda kahverengileşme durumları

(a) Hasanbey, (b) Soğancı, (c) 4 mg/l 2,4 D+0,0 mg/l BA, (d) 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA

Çeşitler kahverengileşme oranları bakımından tek tek incelendiğinde yine uygulamalar arasındaki farklılıklar çok önemli olarak bulunmuştur. Kabaası çeşidinde en yüksek oran %51,15 ile 4 mg/l 2,4-D+0,0 mg/l BA uygulamasında, en düşük ise %8,85 ile 4 mg/l NAA+0,1 mg/l BA ve 8 mg/l NAA+0,1 mg/l BA uygulamalarında belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.'de de görüldüğü gibi Kabaası çeşidinde Dikamba ve NAA'nın yüksek dozları, 2,4-D'nin düşük dozu kahverengileşme üzerine daha etkili olmuştur. Soğancı çeşidinde en yüksek oluşum %50,77 ile 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA uygulamasında, en düşük %0.0 ile 4 mg/l NAA+0 mg/l BA, 8 mg/l 2,4-D+0 mg/l BA ve 8 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA uygulamalarında tespit edilmiştir. Soğancı ve Hacıhaliloğlu çeşitlerinde de kabaası çeşidinde olduğu gibi Dikamba ve NAA'nın yüksek dozu, 2,4-D'nin düşük dozu kahverengileşme üzerine daha fazla etkileri olmuştur. Hacıhaliloğlu çeşidinde en yüksek kahverengileşme %63,44 ile 8 mg/l 2,4-D+0,0 mg/l BA uygulamasında belirlenmiştir. 4 mg/l NAA+0,1 mg/l BA ise hiç kahverengileşme olmamıştır. Hasanbey çeşidinde en yüksek %81,14 ile 8 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA uygulamasında, en düşük ise kontrol ve 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamalarında hiç %0.0 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2). Hasanbey çeşidinde Dikamba ve 2,4-D'nin yüksek NAA'nın düşük dozları kahverengileşmede etkili olmuştur (Çizelge 4.2.)

4.2. Rejenerasyon aşamasında farklı uygulamaların etkisi

4.2.1. Genotipin ve uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi (ESEKO)

Kallus oluşum ortamında bir ay süre ile bekletilen eksplantlar kalluslar oluştuktan sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamında 2-4 mg/l BA, 2-4 mg/l TDZ, 0-0,1 mg/l 2,4-D, 0-0,25mg/l spermin ve 0-0,25 mg/l putresin kullanılmıştır. Bu hormon kombinasyonlarının kullanıldığı rejenerasyon ortamında kalluslar 15 gün bekletilmiş, daha sonra kallusların yarısı yine aynı ortama yarısı ise hormonsuz ortama aktarılmıştır. Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyogenik kallus adı verilir. Embriyogenik kallus; kompakt yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklerde (Hatipoğlu 1997). Rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların çeşitler arası gösterdikleri embriyogenik kallus oluşum farklılıkları önemsiz olarak bulunmuştur. Uygulamalar arası farklılık ise istatistiksel anlamda çok önemli olmuştur. En yüksek embriyogenik kallus oluşumu %78,75 ile K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 Spermin) uygulamasında saptanırken, en düşük oluşum %11,25 ile 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25

Putresin uygulamasında saptanmıştır. Diğer uygulamalarda hemen hemen aynı embriyogenik kallus oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.3. ve Çizelge 4.3). Çizelge 4.3.'den de görüldüğü gibi uygulamalarda hem aynı hormonlu ortama aktarılan kalluslarda hem de daha önceden hormonlu olup ikinci alt kültürde hormonsuz ortama aktarılan kalluslarda TDZ'nin ve BA'nın yüksek dozları embriyogenik kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Genel itibariyle 2,4-D'nin 0,1 mg/l dozunda katılımı da embriyogenik kallus oluşumunda etkili olmuştur.



Şekil 4.3. Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında embriyogenik kallus oluşum oranı üzerine etkileri,

(a) 15 gün 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 Spermin uygulamasında tutulup hormonsuz ortama aktarılan uygulama, (b) 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 Putresin

Çizelge 4.3 Rejenerasyon kültür ortamında çeşit ve uygulamalara göre embriyogenik kallus oluşumu oranları (%)

Çeşit						
Uygulama	Poliamin	Hasanbey	Soğanacı	Kabaaşı	H.Haliloğlu	Ortalama
2mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	67,50ab**	56,25ab**	67,50ab**	0,00b**	45,00a-g**
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	45,00ab	11,25g
	Spermin	0,00b	45,00ab	0,00b	90,00a	33,75b-g
2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	45,00ab	67,50ab	67,50ab	0,00b	50,63a-g
	Putresin	45,00ab	45,00ab	0,00b	90,00a	45,00a-g
	Spermin	67,50ab	33,75ab	0,00b	45,00ab	28,13c-g
4mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	60,00ab	30,00ab	0,00b	0,00b	15,00fg
	Putresin	45,00ab	56,25ab	0,00b	0,00b	28,13c-g
	Spermin	90,00a	56,25ab	90,00a	90,00a	73,13ab
4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	25,39ab	57,69ab	52,50ab	90,00a	64,47a-d
	Putresin	45,00ab	67,50ab	0,00b	0,00b	33,75b-g
	Spermin	67,50ab	56,25ab	60,00ab	0,00b	43,13a-g
2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	67,50ab	33,75ab	0,00b	45,00ab	28,13c-g
	Putresin	30,00ab	60,00ab	72,32ab	45,00ab	59,33a-e
	Spermin	62,69ab	50,09ab	0,00b	0,00b	25,05d-g
2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	52,50ab	62,41ab	76,72ab	90,00a	72,88ab
	Putresin	0,00b	45,00ab	0,00b	90,00a	45,00a-g
	Spermin	0,00b	0,00b	72,32ab	90,00a	40,58a-g
4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	17,69ab	23,84ab	45,00ab	67,50ab	22,50efg
	Putresin	0,00b	0,00b	45,00ab	67,50ab	28,13c-g
	Spermin	0,00b	22,50ab	0,00b	45,00ab	40,05a-g
4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	52,50ab	47,89ab	45,00ab	0,00b	35,20b-g
	Putresin	0,00b	45,00ab	45,00ab	72,32ab	51,83a-g
	Spermin	0,00b	45,00ab	90,00a	0,00b	45,00a-g
K(2mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	72,32ab	90,00a	40,58a-g
	Putresin	0,00b	45,00ab	0,00b	90,00a	33,75b-g
	Spermin	0,00b	0,00b	54,63ab	90,00a	36,16b-g
K(2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	45,00ab	90,00a	33,75b-g
	Putresin	54,63ab	19,63ab	0,00b	90,00a	41,06a-g
	Spermin	90,00a	30,00ab	0,00b	90,00a	52,50a-g
K(4mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	62,69ab	0,00b	90,00a	0,00b	38,17a-g
	Putresin	90,00a	0,00b	90,00a	90,00a	67,50abc
	Spermin	0,00b	27,32ab	0,00b	45,00ab	18,08efg
K(4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00a	90,00a	54,63ab	0,00b	58,66a-e
	Putresin	45,00ab	90,00a	0,00b	0,00b	33,75b-g
	Spermin	90,00a	90,00a	45,00ab	90,00a	78,75a
K(2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00a	0,00b	45,00ab	0,00b	38,57a-g
	Putresin	22,50ab	45,00ab	75,00ab	45,00ab	46,88a-g
	Spermin	72,32ab	0,00b	0,00b	0,00b	18,08efg
K(2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00a	45,00ab	15,00ab	52,50ab	50,63a-g
	Putresin	67,50ab	0,00b	0,00b	90,00a	39,38a-g
	Spermin	0,00b	45,00ab	27,32ab	62,69ab	33,75b-g
K(4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	76,72ab	62,69ab	0,00b	34,85b-g
	Putresin	90,00a	0,00b	90,00a	45,00ab	56,25a-f
	Spermin	0,00b	60,00ab	45,00ab	67,50ab	43,13a-g
K(4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00a	0,00b	90,00a	15,00ab	39,38a-g
	Putresin	72,32ab	27,32ab	90,00a	45,00ab	58,66a-e
	Spermin	0,00b	22,50ab	90,00a	45,00ab	48,75a-g
ORTALAMA		40,79 ^{ÖD}	38,77	39,80	47,81	

K: Hormonsuz ortam

ÖD: önemsiz

Rejenerasyon ortamında kallusların gösterdiği embriyogenik kallus oluşum oranları çeşitler bazında incelendiğinde bütün çeşitlerde istatistiksel olarak önemli farklılıkların olduğu saptanmıştır. İlk olarak Hasanbey çeşidinde en yüksek embriyogenik kallus oluşumu %90,00 ile 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında belirlenirken, en düşük oluşum %0,0 ile 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında saptanmıştır (Çizelge 4.3.).

Soğancı çeşidinde en yüksek oluşum %90,00 ile K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında, en düşük ise 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında saptanmıştır (Çizelge 4.3.).

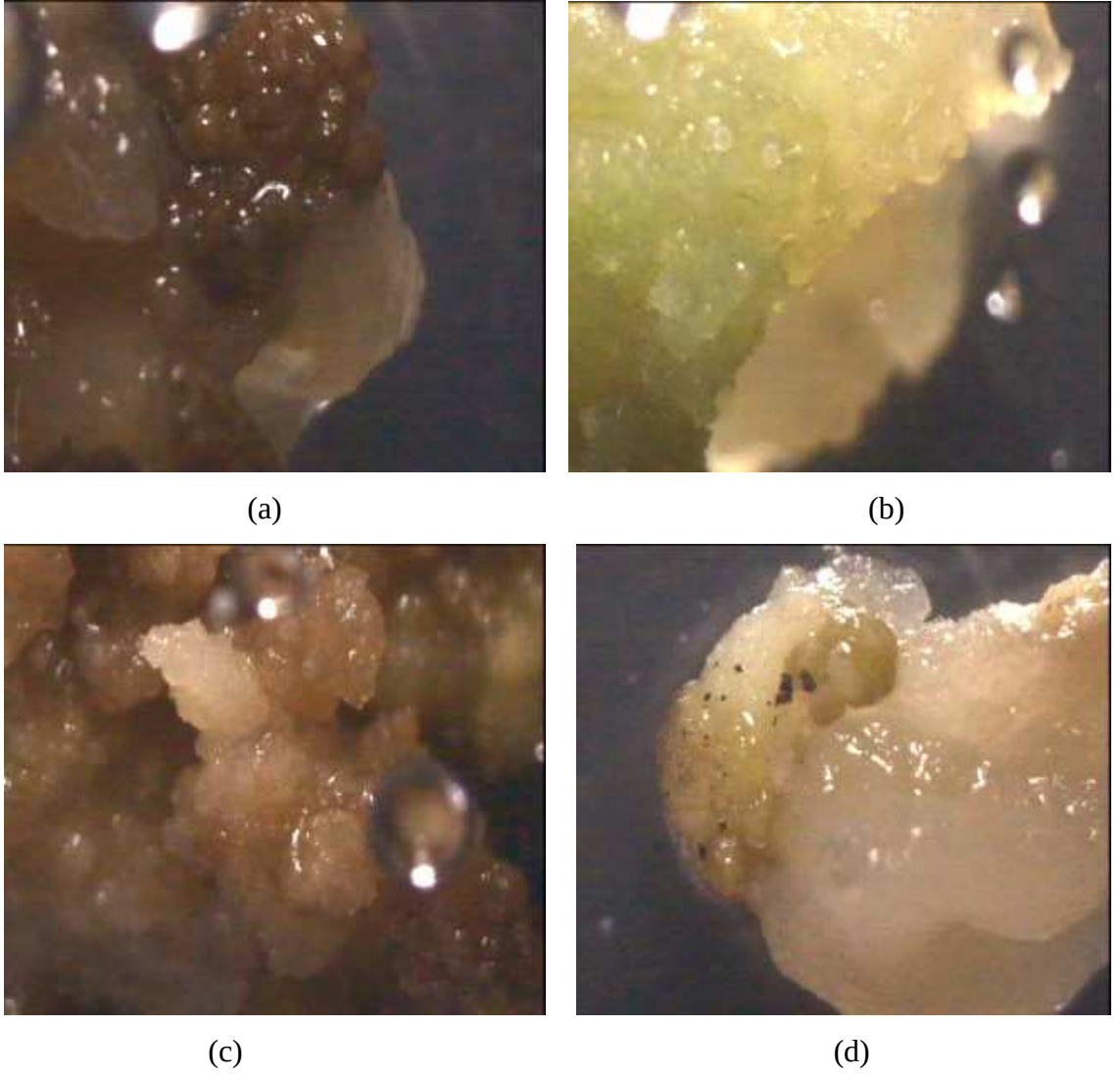
Kabaaşı çeşidinde en iyi oluşum %90,00 ile 4 BA 0 2,4-D Spermin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında, en düşük 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Hacıhaliloğlu çeşidinde en yüksek oran %90,00 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0,1 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin),

K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamalarında saptanmıştır. Diğer uygulamalarda ise hemen hemen birbirine yakın oluşumlar belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

4.2.2. Çeşitlerin ve uygulamaların kahverengileşme oranına etkisi (KahO)

Rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların çeşitler arası gösterdikleri kahverengileşme oranları bakımından denemede kullanılan çeşitler arasında farklılık çok önemli olarak bulunmuştur ($p<0,01$). En fazla kahverengileşme görülen çeşit %40,10 ile Hasanbey olurken en az kahverengileşme görülen çeşit %24,96 ile Hacıhaliloğlu olmuştur. Uygulamalar arasında ise en yüksek kahverengileşme %65,19 ile 15 gün 4 mg/l TDZ+0,0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin içeren ortamda bekletilip daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamada saptanırken, en düşük kahverengileşme %12,26 ile yine rejenerasyon aşamasında 15 gün 4 mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin içeren ortamda bekletilip daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamadan elde edilmiştir. Diğer uygulamalarda ise hemen hemen aynı oranlarda kahverengileşme meydana gelmiştir (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.5). Çizelge 4.4'den de görüldüğü gibi uygulamalarda hem aynı hormonlu ortama aktarılan kalluslarda hem de daha önceden hormonlu olup ikinci alt kültürde hormonsuz ortama aktarılan kalluslarda TDZ'nin ve BA'nın yüksek dozları kahverengileşme oranının artmasında etkili olmuştur. Aynı zamanda kombinasyonlarda ise 2,4-D'nin 0 mg/l dozu kahverengileşmeyi artırmıştır.



Şekil 4.4. Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında kahverengileşme oranı üzerine etkileri,

(a) Hasanbey, (b) Hacihaliloğlu, (c) 4 mg/l TDZ+0,0 mg/l 2,4-D 0,25 mg/l Spermin, (d) 15 gün 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin ortamında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulama

Çizelge 4.4. Rejenerasyon kültür ortamında çeşit ve uygulamalara göre kahverengileşme oranları (%)

Çeşit		Poliamin	Hasanbey	Soğancı	Kabaası	H.Haliloğlu	Ortalama
Uygulama							
2mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	33,21a-d**	33,21abc**	33,21ab**	0,00e**	24,90c-ı**	
	Putresin	56,79abc	61,22abc	80,78a	41,67a-e	60,67ab	
	Spermin	45,01a-d	45,00abc	35,78ab	0,00e	31,44c-ı	
2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	47,88a-d	23,94abc	19,62ab	0,00e	16,87f-ı	
	Putresin	34,60a-d	39,80abc	0,00b	0,00e	19,90d-ı	
	Spermin	33,21a-d	61,60abc	0,00b	0,00e	30,80c-ı	
4mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	16,60a-d	44,08abc	39,25ab	45,00a-e	43,10a-g	
	Putresin	45,00a-d	51,05abc	33,21ab	63,44ab	49,68abc	
	Spermin	18,44a-d	19,03abc	47,88ab	16,60cde	25,63c-ı	
4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	45,01a-d	31,72abc	16,60ab	29,88a-e	27,48c-ı	
	Putresin	45,00a-d	41,30abc	45,00ab	26,56b-e	38,54a-ı	
	Spermin	13,28bcd	13,28bc	50,77ab	0,00e	19,33e-ı	
2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	50,77a-d	53,78abc	0,00b	0,00e	26,89c-ı	
	Putresin	61,16abc	47,88abc	16,60ab	25,82b-e	34,55b-ı	
	Spermin	9,22cd	17,30abc	67,50ab	67,50ab	42,40a-h	
2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00d	16,60bc	42,12ab	16,60cde	22,98c-ı	
	Putresin	45,00a-d	27,11abc	48,02ab	0,00e	25,56c-ı	
	Spermin	49,06a-d	47,03abc	35,78ab	13,28de	35,78b-ı	
4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	35,78a-d	42,05abc	19,62ab	45,01a-e	37,18a-ı	
	Putresin	63,44abc	61,77abc	35,78ab	0,00e	39,83a-ı	
	Spermin	52,38a-d	56,25abc	35,78ab	53,78a-d	50,51abc	
4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	45,00a-d	45,00abc	45,00ab	29,88a-e	41,22a-ı	
	Putresin	61,16abc	48,69abc	52,38ab	37,61a-e	46,84a-e	
	Spermin	56,79abc	28,39abc	9,22b	0,00e	16,50ghı	
K(2mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	56,79abc	0,00c	37,61ab	9,22de	25,90c-ı	
	Putresin	71,56a	38,66abc	45,00ab	33,21a-e	47,10a-e	
	Spermin	71,56a	0,00c	50,77ab	0,00e	30,58c-ı	
K(2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00d	0,00c	50,77ab	33,21a-e	20,99c-ı	
	Putresin	26,56a-d	70,38ab	0,00b	0,00e	24,23c-ı	
	Spermin	18,44a-d	56,74abc	47,88ab	0,00e	30,76c-ı	
K(4mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	45,00a-d	49,06abc	39,25ab	50,77a-d	46,02a-f	
	Putresin	53,78a-d	50,77abc	56,79ab	33,21a-e	48,63a-e	
	Spermin	56,79abc	25,38abc	63,44ab	45,00a-e	47,65a-e	
K(4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	64,17abc	0,00c	0,00b	39,25a-e	25,85c-ı	
	Putresin	37,61a-d	0,00c	50,77ab	0,00e	22,09c-ı	
	Spermin	0,00d	0,00c	39,25ab	13,28de	13,13hı	
K(2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	18,44a-d	71,56ab	39,10ab	49,06a-d	40,68a-ı	
	Putresin	28,39a-d	0,00c	35,78ab	35,78a-e	24,98c-ı	
	Spermin	35,78a-d	0,00c	45,01ab	45,00a-e	31,44c-ı	
K(2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	33,21a-d	57,78abc	32,90ab	0,00e	30,97c-ı	
	Putresin	0,00d	80,78a	41,99ab	0,00e	30,69c-ı	
	Spermin	71,56a	45,00abc	45,01ab	25,38b-e	46,73a-e	
K(4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	26,56a-d	16,60bc	0,00b	71,56a	28,68c-ı	
	Putresin	71,56a	73,39ab	63,44ab	52,38a-d	65,19a	
	Spermin	0,00d	56,79abc	0,00b	58,28abc	28,76c-ı	
K(4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	67,50ab	80,78a	0,00b	49,06a-d	49,33a-d	
	Putresin	56,79abc	45,00abc	34,60ab	41,99a-e	44,59a-g	
	Spermin	49,06a-d	0,00c	0,00b	0,00e	12,26ı	
ORTALAMA		40,1030a**	36,4463a	33,9442a	24,9649b		

K: Hormonsuz ortam

Rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların kahverengileşme oranları çeşitler bazında incelendiğinde dört çeşitte istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Hasanbey çeşidinde en fazla kahverengileşme %71,56 ile önce 15 gün 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Spermin ve 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Putresin içeren ortamında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamalarda olurken, en düşük %0,0 ile 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+ 0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Soğancı çeşidinde en fazla kahverengileşme %80,78 ile K(2mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) ve K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamalarında saptanırken, en düşük %0,0 ile K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 Spermin) uygulamalarında belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

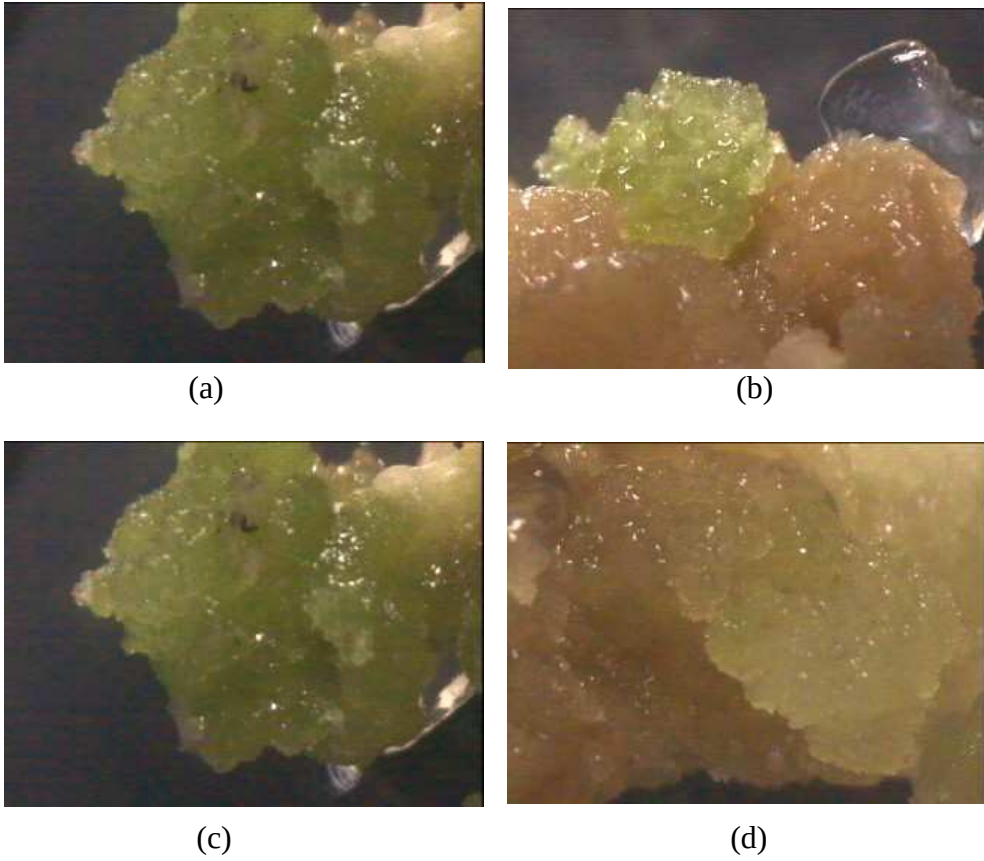
Kabaaşı çeşidinde en yüksek oran %80,78 ile 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin uygulamasında, en düşük %0,0 ile 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamalarında saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Son olarak Hacıhaliloğlu çeşidinde ise en yüksek kahverengileşme oranı %71,56 ile K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamasında saptanmış, en düşük oran %0,0 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l

Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l TDZ+0,1 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0 mg/l+2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0,1 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

4.2.3. Çeşitlerin ve uygulamaların rejenerasyon oluşumuna etkisi (RO)

Rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların çeşit ve uygulamalara göre gösterdikleri rejenerasyon oluşumu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çeşitler içinde en iyi oluşum %24,84 ile Hasanbey çeşidinde olurken en zayıf oluşum %13,95 ile soğancı çeşidinde olmuştur. Uygulamalarda ise en iyi rejenerasyon oluşumu %56,25 ile K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamasında elde edilirken, daha önceden 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol-Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin ortamlarında bekletilip 15 gün sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamalar ve 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin-Putresin-Kontrol, 4 mg/l+0 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamalarında bekletilen kalluslarda hiç rejenerasyon oluşumu meydana gelmemiştir (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.5). Çizelge 4.5’de de görüldüğü gibi uygulamalarda BA ve TDZ’nin yüksek dozları, hormonsuz ortamda ise BA ve TDZ’nin düşük dozları rejenerasyon oluşumunda daha etkili olmuştur. Hormonların kombinasyon halinde kullanımında ise genelde 2,4-D’nin 0,1 mg/l dozu ve poliaminlerin kullanımı rejenerasyonu teşvik etmiştir.



Şekil 4.5. Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında rejenerasyon oluşumuna etkileri

(a) Hasanbey, (b) Soğancı, (c) 15 gün 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulama, (d) 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin

Çizelge 4.5. Rejenerasyon kültür ortamında çeşit ve uygulamalara göre rejenerasyon oluşum oranları (%)

Çeşit						
Uygulama	Poliamin	Hasanbey	Soğancı	Kabaaşı	H.Haliloğlu	Ortalama
2mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00b**	0,00b**	0,00b**	0,00b**	0,00e**
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
	Spermin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	45,00ab	22,50ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
	Putresin	22,50ab	11,25b	0,00b	0,00b	5,63e
	Spermin	22,50ab	11,25b	0,00b	45,00ab	16,88a-e
4mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	45,00ab	22,50ab	0,00b	45,00ab	22,50a-e
	Putresin	45,00ab	22,50ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
	Spermin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	45,00ab	22,50ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
	Putresin	45,00ab	22,50ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
	Spermin	0,00b	0,00b	30,00ab	0,00b	7,50de
2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	67,50ab	33,75ab	90,00a	0,00b	39,38a-e
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	27,32ab	6,83e
	Spermin	45,00ab	37,50ab	0,00b	0,00b	18,75a-e
2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	37,50ab	18,75ab	0,00b	0,00b	9,38c-e
	Putresin	90,00a	45,00ab	45,00ab	0,00b	33,75a-e
	Spermin	45,00ab	45,00ab	0,00b	0,00b	22,50a-e
4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	72,32ab	58,66ab	17,69b	0,00b	33,75a-e
	Putresin	90,00a	45,00ab	0,00b	45,00ab	33,75a-e
	Spermin	90,00a	45,00ab	45,00ab	0,00b	33,75a-e
4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00b	0,00b	0,00b	72,32ab	18,08a-e
	Putresin	90,00a	45,00ab	0,00b	0,00b	22,50a-e
	Spermin	67,50ab	33,75ab	0,00b	45,00ab	28,13a-e
K(2mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
	Spermin	0,00b	0,00b	0,00b	90,00a	22,50a-e
K(2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	0,00b	90,00a	22,50a-e
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	90,00a	22,50a-e
	Spermin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
K(4mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	45,00ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
	Spermin	0,00b	45,00ab	0,00b	0,00b	11,25b-e
K(4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	90,00a	0,00b	0,00b	22,50a-e
	Putresin	22,50ab	0,00b	0,00b	0,00b	5,63e
	Spermin	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00e
K(2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	45,00ab	45,00ab	25,71a-e
	Putresin	75,00ab	45,00ab	45,00ab	45,00ab	52,50ab
	Spermin	45,00ab	90,00a	45,00ab	15,00ab	48,75a-d
K(2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	45,00ab	57,32ab	37,50ab	34,95a-e
	Putresin	22,50ab	0,00b	90,00a	90,00a	50,63abc
	Spermin	0,00b	45,00ab	22,50ab	0,00b	16,88a-e
K(4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	45,00ab	0,00b	11,25b-e
	Putresin	0,00b	0,00b	0,00b	90,00a	22,50a-e
	Spermin	45,00ab	30,00ab	45,00ab	0,00b	30,00a-e
K(4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00b	0,00b	90,00a	75,00ab	41,25a-e
	Putresin	17,69ab	17,69ab	0,00b	45,00ab	20,09a-e
	Spermin	0,00b	90,00a	90,00a	45,00ab	56,25a
ORTALAMA		24,84a**	13,95b	16,72ab	21,61ab	

K: Hormonsuz ortam

Rejenerasyon ortamında kallusların çeşitler bazında uygulamalara göre gösterdikleri rejenerasyon farklılıkları önemli bulunmuştur. Buna göre Hasanbey çeşidinde en çok rejenerasyon oluşumu %90,00 ile 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin ve 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin uygulamasında belirlenmiş, en düşük %0,0 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin gibi uygulamalarında saptanmıştır (Çizelge 4.5).

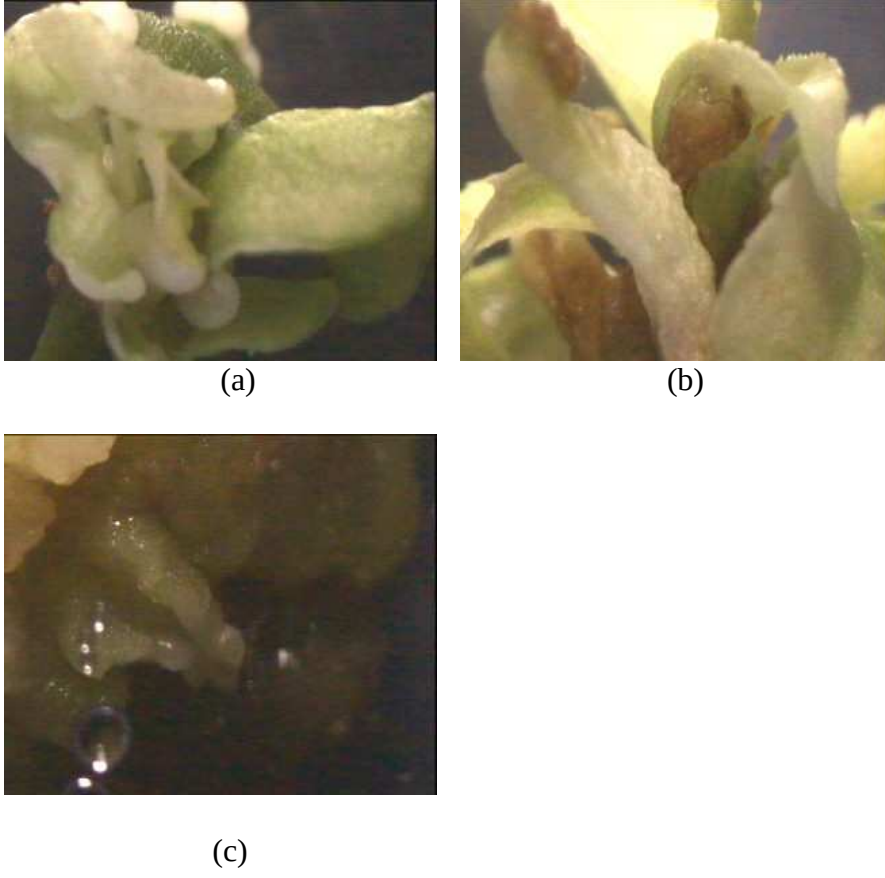
Soğancı çeşidinde en yüksek rejenerasyon oluşumu %90,00 ile K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamalarında meydana gelirken, yine en düşük oluşum %0,0 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, uygulamalarında meydana gelmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5.'de de görüldüğü gibi Kabaaşı çeşidinde en yüksek oran %90,00 ile 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında, en düşük %0,0 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin gibi uygulamalarda olmuştur (Çizelge 4.5).

Hacıhaliloğlu çeşidinde en yüksek rejenerasyon %90,00 ile K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamaları, en düşük %0,0 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol gibi uygulamalarda saptanmıştır. Diğer uygulamalarda ise yine birbirine yakın oranlarda rejenerasyon saptanmıştır (Çizelge 4.5).

4.2.4. Çeşit ve uygulamaların sürgün oluşumuna etkisi (SO)

İkinci kültür ortamına aktarılan kallusların çeşitler ve uygulamalar arası gösterdikleri sürgün oluşum farklılıkları önemli olarak bulunmuştur. Buna göre çeşitler içinde en iyi sürgün oluşumu %22,87 ile Hasanbey çeşidinde gözlenirken, en az sürgün oluşumu %10,79 ile Hacıhaliloğlu çeşidinde gözlenmiştir. Uygulamalar arasında en iyi gelişim %67,50 ile K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamasında, en az gelişim %5,63 ile 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında meydana gelmiştir. 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol, 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin gibi uygulamalarında ise hiç sürgün gelişimi saptanmamıştır (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6). Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi uygulamalarda hem aynı hormonlu ortama aktarılan kalluslarda hem de daha önceden hormonlu olup ikinci alt kültürde hormonsuz ortama aktarılan kalluslarda TDZ'nin ve BA'nın düşük dozları sürgün oluşumu üzerine etkili olmuştur. Kombinasyon halinde kullanımlarda ise 2,4-D'nin ise 0 mg/l dozu ve poliaminler sürgün oluşumunu teşvik etmiştir.



Şekil 4.6. Farklı çeşit ve uygulamaların rejenerasyon aşamasında sürgün oluşumuna etkileri

(a) Hasanbey, (b) 15 gün 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında tutulup hormonsuz ortama aktarılan uygulama, (c) 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l spermin

Çizelge 4.6. Rejenerasyon kültür ortamında çeşit ve uygulamalara göre sürgün oluşum oranları (%)

Çeşit						
Uygulama	Poliamin	Hasanbey	Soğancı	Kabaaşı	H.Haliloğlu	Ortalama
2mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00**	0,00d**	0,00c**	0,00c**	0,00h**
	Putresin	90,00	60,00abc	0,00c	0,00c	33,75c-f
	Spermin	62,69	0,00d	0,00c	0,00c	15,67fgh
2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	90,00a	22,50d-h
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	0,00	0,00d	90,00a	0,00c	22,50d-h
4mg/l BA+0mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	45,00bc	45,00b	22,50d-h
	Putresin	0,00	0,00d	90,00a	0,00c	22,50d-h
	Spermin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	0,00	0,00d	90,00a	90,00a	45,00bcd
	Spermin	0,00	22,50cd	0,00c	90,00a	33,75c-f
2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	22,50	56,25abc	0,00c	45,00b	39,38abc
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	0,00	0,00d	22,50c	0,00c	5,63gh
2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	45,00	22,50cd	0,00c	0,00c	11,25fgh
4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	45,00	67,50ab	0,00c	0,00c	33,75c-f
	Spermin	0,00	11,25d	0,00c	0,00c	5,63g-h
4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
K(2mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	45,00	0,00d	0,00c	0,00c	11,25fgh
	Putresin	90,00	45,00bcd	0,00c	0,00c	33,75c-f
	Spermin	90,00	0,00d	0,00c	0,00c	22,50d-h
K(2mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00	0,00d	0,00c	0,00c	22,50d-h
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	0,00	0,00d	90,00a	0,00c	22,50d-h
K(4mg/l BA+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	0,00	45,00bcd	90,00a	0,00c	33,75c-f
	Spermin	90,00	0,00d	90,00a	90,00a	67,50a
K(4mg/l BA+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	90,00a	22,50d-h
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	0,00	0,00d	45,00bc	0,00c	11,25fgh
K(2mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00	90,00a	0,00c	90,00a	64,29ab
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	90,00a	22,50d-h
	Spermin	0,00	0,00d	67,50ab	37,50b	26,25d-g
K(2mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00	0,00d	34,50bc	0,00c	8,63gh
	Putresin	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Spermin	90,00	0,00d	0,00c	17,69bc	26,92d-g
K(4mg/l TDZ+0mg/l 2,4 D)	Kontrol	90,00	0,00d	17,69c	90,00a	49,42abc
	Putresin	0,00	45,00bcd	0,00c	0,00c	11,25fgh
	Spermin	90,00	0,00d	0,00c	0,00c	22,50d-h
K(4mg/l TDZ+0,1mg/l 2,4 D)	Kontrol	0,00	0,00d	0,00c	0,00c	0,00h
	Putresin	0,00	40,19bcd	0,00c	0,00c	10,05fgh
	Spermin	67,50	0,00d	0,00c	0,00c	16,88e-h
ORTALAMA		22,87a**	18,02ab	16,09bc	10,79c	

K: Hormonsuz ortam

İkinci kültür ortamına aktarılan kallusların gösterdikleri sürgün oluşumu oranları çeşitler bazında istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur. Hasanbey çeşidinde en yüksek sürgün oluşumu %90,00 ile 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında, en düşük ise %22,50 ile 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Soğancı çeşidinde en yüksek oran %90,00 ile K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamasında görülürken, en düşük oran %11,25 ile 4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Kabaaşı çeşidinde en yüksek %90,00 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) ve K(2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamalarında, en düşük %17,69 ile K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamasında meydana gelmiştir (Çizelge 4.6).

Hacıhaliloğlu çeşidinde en yüksek oran %90,00 ile 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin, 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin, 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol, K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol), K(2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin), K(4 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+Kontrol) ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+Kontrol) uygulamalarında saptanırken, en düşük oran %17,69 ile K(2 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulamasında saptanmıştır (Çizelge 4.6). Bunun akabinde Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi her dört çeşidinde bazı uygulamalarında hiç sürgün oluşumu meydana gelmemiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada bazı kayısı çeşitlerinde (kabaası, soğancı, hacıhaliloğlu, hasanbey) kültüre alınan olgun embriyoların gösterdikleri kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve sürgün oluşumu performansları belirlenmiştir.

5.1. Çeşitlerin Kallus Sayısı, Embriyogenik Kallus Oluşumu, Bitki Rejenerasyonu ve Sürgün Gelişimine Etkisi

Yapılan çalışmada birinci kültür ortamında oluşan kallus sayısına çeşitlerin gösterdikleri etki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. İkinci kültür ortamında çeşitlerin embriyogenik kallus oluşumuna gösterdikleri etki önemsiz olarak bulunmuş, bunun yanında ikinci kültür ortamında çeşitlerin bitki rejenerasyonu ve sürgün gelişimine gösterdikleri etki önemli olarak saptanmıştır. Bitki rejenerasyon oluşumu en yüksek %24,84 ile Hasanbey çeşidi, en düşük %13,95 ile Soğancı çeşidinde belirlenmiş, sürgün oluşumunda ise en yüksek %22,87 ile Hasanbey çeşidi, en düşük %10,79 ile Hacıhaliloğlu çeşidi olarak belirlenmiştir. Nitekim, Birsin ve ark. (2001) yulafta yaptıkları bir çalışma kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin çeşit ve hatlara göre değiştiği, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişkinin olmadığı, rejenere bitki sayısının doğrudan kallus oluşumuna bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle adventif sürgün rejenerasyonunun geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyon oluşturan çeşit %90 oranında 3 mg/l BAP+ 0,2 mg/l NAA kombinasyonunu içeren MS ortamı Spok olarak tespit edilmiştir (Darçın 2003). Yine adi diş budak bitkisinin 3 farklı (K-59, N-5, T-3) tipinin olgun embriyolarının in vitro şartlarda MS ortamında kültüre alındığı çalışmada her 10 günde morfogenez gözlenmiş ve T-3 tipi aynı kültür şartları altında morfogenez göstermiş ve 20 gün içinde organlar oluşmuştur (Mockeliunaite and Kuusiene 2004). Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipler arasındaki farklılığın içsel (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Farklı türlerde yapılan çalışmalarda genotiplerin bitki

rejenerasyonu ve sürgün gelişimine göre farklılık arz etmesi ikinci kültür ortamından elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir. Yaptığımız çalışmada kallus ve embriyogenik kallus oluşumuna çeşitlerin etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bunun en önemli sebebi kayısıda varyasyon oranının çok az olmasıdır (Asma 2000).

5.2. Farklı uygulamaların Kallus Sayısı, Embriyogenik Kallus Oluşumu, Bitki Rejenerasyonu ve Sürgün Gelişimine Etkisi

Yapılan birinci kültür ortamında farklı uygulamaların kallus sayısına, ikinci kültür ortamının ise embriyogenik kallus oluşumuna, bitki rejenerasyonuna ve sürgün gelişimine etkisi çok önemli olarak tespit edilmiştir. Birinci kültür ortamında en yüksek kallus oluşumu %84,51 ile 4 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA uygulamasında, en düşük oluşum %47,02 ile 4 mg/l Dikamba+0,1 mg/l BA uygulamasında meydana gelmiştir. Dikamba ve NAA'nın yüksek (8 mg/l), 2,4-D'nin (4 mg/l) düşük dozları kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Kombinasyonlarda ise BA'nın 0,1 mg/l dozunda katılımı kallus oluşumunda etkili olmuştur. İkinci kültür ortamında en yüksek embriyogenik kallus oluşumu %78,75 ile 15 gün 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamada, en düşük %11,25 ile 2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin uygulamasında belirlenmiştir. Uygulamalarda kullanılan hormonlardan BA ve TDZ'nin (4 mg/l) yüksek dozları ve kombinasyonlardan 2,4-D'nin 0,1 mg/l dozu embriyogenik kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Bitki rejenerasyonunda en yüksek oran %56,25 ile 15 gün 4 mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında tutulup hormonsuz ortama aktarılan uygulamada en düşük % 5,63 ile 2 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında tespit edilmiştir. Uygulamalarda kullanılan BA ve TDZ'nin (4 mg/l) yüksek dozları, hormonsuz ortamda ise düşük dozları rejenerasyon oluşumunda etkili olmuştur. Kombinasyonlarda ise 0,1 mg/l dozunda uygulanan 2,4-D rejenerasyonu teşvik etmiştir. Son olarak en yüksek sürgün oluşumu %67,50 ile K(4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin) uygulaması, en düşük ise %5,63 ile 2 mg/l TDZ+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin ve K(4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Putresin) uygulamalarında olmuştur. En yüksek sürgün oluşumu BA ve TDZ'nin (2 mg/l) düşük

dozlarının kullanıldığı uygulamalarda saptanmıştır. Aynı şekilde hormonsuz ortamda da düşük dozlar (2 mg/l) sürgün oluşumunda daha fazla etkili olmuştur. Kombinasyon halindeki uygulamalarda ise 0 mg/l dozunda kullanılan 2,4-D etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlarla embriyogenik kallus oluşumu, rejenerasyon ve sürgün oluşumuna farklı bitki büyüme düzenleyicilerin farklı dozlarının etkili olduğu ortaya koyulmuştur. Nitekim yapılan bir çalışmada Royal kayısı çeşidinin olgun olmayan embriyoları kullanılmış. Çalışmada birinci durumda kallus 4,5 μ M 2,4-D'ye ilave olarak 0,44 μ M BA içeren MS ortamında elde edilmiş ve kalluslardan bitki rejenerasyonu 4,4 μ M BA'ya ilave olarak 1,0 μ M 2,4-D içeren MS ortamında meydana gelmiştir. İkinci durumda genç tomurcuklar 4,4 μ M BA'ya ilave olarak 1,0 μ M 2,4-D içeren MS ortamında kotiledonlardan doğrudan rejenere edilmiştir (Pieterse 1989). Ainsley *et al.* (2004) dört farklı badem çeşidinin olgun olmayan kotiledonlarından genç sürgünler rejenere etmişlerdir. Sürgün rejenerasyon oranı bitki büyümesini düzenleyicilerin bulunmadığı dört haftalık süreyi takiben, TDZ (10,0 M) içeren MS alt kültüründe 8 hafta için kültüre alınan kotiledonlarda en yüksek olmuştur. Verime yatmış melez fındık (*Corylus avellana* L.) bitkileriyle yapılan bir çalışmada poliamin içeren ortam üzerindeki bazı sürgünlerin 4.0 cm'ye kadar, poliamin içermeyen ortam üzerindeki sürgünlerin ise en fazla 2.0 cm'ye kadar büyüebildikleri gözlenmiştir. Bulgular, ortama ilave edildiklerinde poliaminlerin eksplantların kültüre alınmalarını kolaylaştırabileceğini ve morfojenik kapasitelerini artırabileceğini göstermiştir (Nas 2003). *Lasirus scindicus*, *Sorghum halepense* ve *Urochloa panicoides* için potansiyel explant kaynağı olarak genç çiçeklerin bazal kısımları kullanılarak bitki rejenerasyonu için doku kültürü metotları geliştirilmiştir. Somatik embriyogenez ile bitki rejenerasyonu özelliği olan kültür dokularında poliamin seviyesi ve putresin-spermidin oranı arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Kaçkar 2007). Erdoğan (2004) 6 farklı burçak hattına uyguladığı çalışmaya göre Thidiazuron (TDZ) konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan eksplantların sürgün rejenerasyonuna etkisi geniş bir varyasyon göstermiştir.

Sonuç olarak, kayısıda bitki rejenerasyonu ve sürgün oluşumu açısından Hasanbey çeşidi en uygun çeşit olarak belirlenmiştir. En iyi embriyogenik kallus oluşumu 15 gün 4 mg/l BA+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında, bitki rejenerasyonu 4

mg/l TDZ+0,1 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında ve sürgün oluşumu 4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D+0,25 mg/l Spermin uygulamasında tutulup daha sonra hormonsuz ortama aktarılan uygulamalarda tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ainsley, P.J., Hammerschlag, F.A., Bertozzi, T., Collins, G.G., Sedgley, M., 2004. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 221–226.
- Anonim, 1995. Genel Bahçe Bitkiler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları no: 4.
- Anonim, 2004. Tarımsal Yapı, Üretim, Fiyat, Değer. DİE Ankara.
- Anonim, 2007. Bitki doku kültürleri. <http://emyo.sdu.edu.tr/link/sontez31son.doc>
- Asma, B.M, 2000. Kayısı Yetiştiriciliği, 243.
- Aygün, A., Dumanoglu, H., 2006. Bazı Ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotiplerinde Yaprak Disklerinden Sürgün Organogenesisi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2006, 13 (1) 54–61.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 2.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Bagni, N., 1986. The function and metabolism of polyamines in plants. *Acta Hort.* 179. 95-103.
- Berrios, F., E., Gentzbittel, L., Serieys, H., Alibert, G. and Sarrafi, A., 1999. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 65-69.
- Bhaskaran, S., and Smith, R. H., 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop science*, 20, 1328-1336.
- Birsin, M. A., Önde, S. and Özgen, M., 2001. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat. *Turk J. Biol.*, 25, 427-434.
- Carman, J. G., 1990. Embriyogenik cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 26, 746-753.
- Chawla, H. S. and Wenzel, G., 1987. Regeneration potential of callus from wheat and barley. *Archiv fur Zuchtungsforshung*, 17(6), 337–343.
- Costa, G. and Bagni, N., 1983. Effects of Polyamines on Fruit-set of Apple, *Hort. Science*.18(1), 59–61.
- Darçın, E.S., 2003. Bazı Kolza(*Brassica napus* L.) Çeşitlerinde Doku Kültürü Yöntemiyle Bitki Rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- De Jong AJ, Schimidt EDL, De Vries SC (1993). Early events in higher-plant embriyogenesis. *Plant Mol.Biol.*, 22:367-377.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Gürbüz, F., 1993. İstatistik Metotları, 218.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C., Arslan, O., 2004. Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2005, 11(1) 60-64.
- Eşitken, A., Güleryüz, M., Ercişli, S., 1997. Embryo Culture of Hasanbey Apricot Cv. *ISHS Acta Horticulturae* 488 XI International Symposium on Apricot Culture.

- Evans, P.T. and Malmberg, R.L., 1989. Do polyamines have roles in plant development?. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269.
- Galston, A.W., 1983. Polyamines as modulators of plant development, *Bioscience*, 33, 382-388.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Md. Yayın No: 78,83 ss, Menemen, İzmir.
- Gürcan, K., 2003. Bazı Meyve Türlerinin Dişi Organ Dokularından Somatik Embriyo Oluşumu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Gürel E., Uçar Türker A., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi, 36-70.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ders Kitapları. Yayın No:A-58.
- Jarvis, B.C., Yasmin, S. and Coleman, M.T., 1985. RNA and Protein Metabolism During Adventitious Root Formation in Stem Cuttings of *Phaseolus Aureus* cv. Berkin, *Physiol. Plant.* 64, 53–59.
- Kaçkar, A. and Shekhawat, N.S., 2007. Plant Regeneration Through Somatik Embryogenesis and Polyamine Levels in Cultures of Grasses of Thar Desert. *Journal of Cell and Molecular Biology* 6(2): 121–127, 2007.
- Kaur- Sawhrey, R., Flores, H.E. and Galston, A.W., 1980. Polyamine-induced DNA Synthesis and Mitosis in oat Leaf Protoplasts, *Plant Physiol.* 65, 368–371.
- Kireççi, O.A., 2006. Bazı Sentetik Hormonların (Giberillik asit, Spermin, Spermidin, Putresin) Fesleğen (*Ocimum basilicum*) Bitkisinde Morfolojik Yapı ve Uçucu Yağ Kalitesine Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Lauzer, D., 2004. In vitro embryo culture of *Scirpus acutus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:91-95.
- Li, W., Ding. C. H., Hu, Z., Lu, W. and Guo G. Q., 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant science*, 164, 1079–1085.
- Litz, R.E. and D.J.Gray, 1992. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. P.3-34. In: F.A. Hammerschlog and R.E. Litz (eds). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CABI, University Pres, Cambridge.
- Meijer, E.G.M. and Simmonds, J., 1988. Polyamine Levels in Relation to Growth and Somatic Embryogenesis in Tissue Cultures of *Medicago sativa* L., *J. Exp. Botany*, 203, 787–794.
- Mockeliunaite, R., Kuusiene, S., 2004. Organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. by isolated mature embryo culture. *Acta Universitatis, Biology*, Vol. 676, pp.197–200.
- Nas, M.N., 2003. Inclusion of Polyamines in the Medium Improves Shoot Elongation in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Micropropagation. *Turk J Agric For.* 28:189-194.
- Oluk, E.A., Kaşkar, Ç., 2005. Somatic Embryogenesis and Shoot Regeneration from Callus Cultures of *Papaver somniferum* L. cv. Office-95. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 225-227.
- Onay, A., 1998. Somatic Embryogenesis From Mature Seed Cultures of *Pistacia atlantica*. *Turk J Agric For.* 24:465–473.
- Öksüz, Ş. 1993. Doku kültürü yöntemiyle değişik besi ortamlarında beyaz zambak yetiştiriciliği. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 65 s.

- Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri). Ç.Ü. Ziraat Fak. Yayınları 128, Ders Kitabı 2, 486 s., Adana.
- Özgen M., Türet M., Özcan S. and Sancak, C., 1996. Callus İnduction and Plant Regeneration from İmmature and Mature Embryos of Winter Durum Wheat Genotypes. *Plant Breed.*, 115, 455-458.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Repots* 18:331-335.
- Palavan, N. And Galston, A.W. 1982. Polyamine Biosynthesis and Titer During Developmental Stages of *Phaseolus vulgaris*, *Physiol. Plant.* 55:438-444.
- Pieterse, R.E., 1989. Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Volume 19, Number 2. 175-179.
- SAS, 1982. Institute, Cary, NC.
- Rosella, P., Fabiana A. and Bagni, N., 1993. Polyamine uptake and transport in different plant systems. *Current Topics in Plant Physiol.* 1, 21-29.
- Simith, T.A., 1985. Polyamines, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 117-145.
- Srivastav, M., Singh, S.K., Arora, R.L., Krishna, B., 2005. Embryo Culture Studies In Subtropical Peach (*Prunus persica* Batsch.). *ISHS Acta Horticulturae* 662: VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics.
- Tabar, C.W. and Tabar H., 1976. 1,4 Daminobutane (putrescine) spermidine and spermine, *Ann. Rev. Biochem.* 45, 285-306.
- Tarrigiani, P., Altamura, M. M., Pasqua, G., Monacelli, B., Serafini-Fracassini, D. And Bagni N., 1987. Free and Conjugated Polyamines During de novo floral and Vegetative bud Formation in thin cell-layers of Tobacco, *Physiol. Plant.* 70, 453-460.
- Thorpe, T.A., 1981. *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis.* Department of Biology, University of Calgary, Alberta, Canada, 379p.
- Turhan, H., Baser, İ., 2004. Callus Induction from Mature Embryo of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asion Journal of Plant Sciences.* 3(1):17-19.
- Üçler, A.Ö., Mollamehmetoğlu, N., 2001. In vitro plantlet regeneration from mature embryos of linden (*Tilia platyphyllos* Scop.) and multiplication of its buds, *Turk J. Agric. for* 25:181-186.
- Zapata, J. M., Sabater B. and Martin, M., 2004. Callus induction and *in vitro* regeneration from barley mature embryos. *Biologia Plantarum*, 48(3): 473-476.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Erzurum’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden mezun oldu, aynı yıl yüksek lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde araştırma görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen bu göreve devam etmektedir.