

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

131399

BAZI MEYVE TÜRLERİNİN DIŞI ORGAN DOKULARINDA
SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMU

Kahraman GÜRCAN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2003

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMAN TALEP MERKEZİ

131388

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. A. İlhami KÖKSAL danışmanlığında Kahraman GÜRCAN tarafından hazırlanan bu çalışma 05/08/2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. A. İlhami KÖKSAL



Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

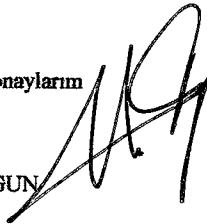


Prof. Dr. Sabahattin ÖZCAN



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Metin OLGUN
Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI MEYVE TÜRLERİNİN DİŞİ ORGAN DOKULARINDAN SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMU

Kahraman GÜRCAN

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. İlhami KÖKSAL

Çalışmada armut (*Pyrus communis* L. cv "Ankara"), ayva (*Cydonia oblonga* Mill. cv "Ekmek"), elma (*Malus x domestica* Borkh. cv "Gloster"), erik (*Prunus domestica* L. cv "Stanley"), kayısı (*Prunus armeniaca* L. cv "Şekerpare"), kiraz (*Prunus avium* L. cv "Dalbastı"), vişne (*Prunus cerasus* L. cv "Kütahya"), ceviz (*Juglans regia* L. "Kaman"), fındık (*Corylus avellana* L. cv "Tombul") ve limonda (*Citrus limon* (L.) Burm. cv. "Kara limon") dişî organ dokularından stigma, stil ve ovaryumdan somatik embriyo ve kallus oluşum oranları üzerine 1, 3, 5 mg/l benziladenin (BA) ve 2,4-diklorofenoksiasetikasitin (2,4-D) etkileri incelenmiştir. Besin ortamı olarak 500 mg/l malt ekstrakt, 50 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar katılan değiştirilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı esas alınmıştır. Kùltürler 25±1°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda inkùbe edilmiştir. 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.

2003, 54 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: Somatik embriyo oluşumu, kallus, dişî organ, stigma, stil, ovaryum, BA, 2,4-D, armut, ayva, elma, erik, kayısı, kiraz, vişne, ceviz, fındık, limon.

ABSTRACT

Master Thesis

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM PISTILS OF SOME FRUITS CROPS

Kahraman GÜRCAN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. A. İlhami KÖKSAL

The effects of 1,3, and 5 mg/l 6-benzylaminopurine (BA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the rate of somatic embryogenesis and callus formation from pistils' stigma, style, and ovary of pear (*Pyrus communis* L. cv 'Ankara'), quince (*Cydonia oblonga* Mill. cv 'Ekmek'), apple (*Malus x domestica* Borkh. cv 'Gloster'), plum (*Prunus domestica* L. cv 'Stanley'), apricot (*Prunus armeniaca* L. cv 'Şekerpare'), sweet cherry (*Prunus avium* L. cv 'Dalbastı'), sour cherry (*Prunus cerasus* L. cv 'Kütahya'), walnut (*Juglans regia* L. 'Kaman'), hazelnut (*Corylus avellana* L. cv 'Tombul') and lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. cv 'Kara limon') were investigated. Modified Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 500 mg/L malt extract, 50 g/l sucrose and 7 g/l agar was used as basal medium. The cultures were incubated at 25±1°C under 16-photoperiod. As a result of two years repeated research, especially callus formation occurred from all species except plum on medium containing 2,4-D. Somatic embryos were only obtained from lemon's styles and stigmas on 5 mg/l BA treatment with percentages of 23.5% and 21%.

2003, 54 pages

Key Words: Somatic embriyogenesis, callus, pistil, stigma, style, ovarium BA, 2,4-D, pear, quince, apple, plum, apricot, sweet cherry, sour cherry, walnut, hazelnut, lemon.

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji ve meyve ıslahı üzerine çalışma isteğimi destekleyen, tez çalışmam süresince yanımda olan yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. A. İlhami KÖKSAL ile Sayın Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU'na, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki teknik desteğinden dolayı arkadaşım Emir BİRANT'a, laboratuvar çalışmam sırasında yardımına koşan Araş. Gör. Ahmet AYGÜN ve Araş. Gör. Bekir ŞAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince, tezimin yürütülmesinde gerekli olan bütün olanaklardan yararlanma imkanı sağlayan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanlığına, Bölümümüzün tüm değerli Öğretim Elemanlarına ve İdari Personeline şükranlarımı sunarım.

Kahraman GÜRCAN
Ankara, Temmuz 2003

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Meyve Türlerinde Zigotik Dokulardan Somatik Embriyo Oluşumu İle İlgili Yapılan Çalışmalar	4
2.2. Meyve Türlerinde Somatik Dokulardan Somatik Embriyo Oluşumu İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	8
2.2.1. Eşey organları ve nusellar dokulardan somatik embriyo oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalar.....	8
2.2.2. Diğer somatik dokulardan somatik embriyo oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalar.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Eksplantların hazırlanması ve dikimi.....	15
3.2.2. Besin ortamı.....	16
3.2.3. Kültür koşulları.....	16
3.2.4. Veri analizi.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	19
4.1. Armutta Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	19
4.2. Ayvada Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	22
4.3. Elmada Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	24
4.4. Erikte Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	26
4.5. Kayısıda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	26
4.6. Kirazda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	28

4.7. Vişnede Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	30
4.8. Cevizde Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	32
4.9. Fındıkta Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	34
4.10. Limonda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu.....	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

SİMGELER DİZİNİ

1/2 MS	Yarı kevvette Murashige ve Skoog besin ortamı
2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
2iP	6-dimetilaminopurin
4-CPPU	N-2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
BA	Benziladenin (n-(penylmetyl)-1H-purin-6 amine)
C	Celsius
g	Gram
GA ₃	Gibberellik asit
g/mol	Gram/mol
g/l	Gram/litre
h	Saat
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole butiric acid
KIN	Kinetin
mm	Milimetre
mM	Milimol
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
mg/l	Miligram/litre
NAA	Naftalenasetic acid
TCL	Thin cell layer (İnce hücre tabakası)
TDZ	Thidiazuron
μM	Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Ankara armudunda ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	20
Şekil 4.2.	Ankara armudunda 3 mg/l BA uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusların görünümü.....	20
Şekil 4.3.	Ankara armudunda 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.....	21
Şekil 4.4.	Ankara armudunda 3 mg/l BA uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.....	21
Şekil 4.5.	Ekmek ayvasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	23
Şekil 4.6.	Ekmek ayvasında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.....	23
Şekil 4.7.	Gloster elmasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	25
Şekil 4.8.	Gloster elmasında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.....	25
Şekil 4.9.	Şekerpare kayısısında ovaryum dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	27
Şekil 4.10.	Şekerpare kayısısında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.....	27
Şekil 4.11.	Şekerpare kayısısında ovaryumdan kallus oluşumu.....	28
Şekil 4.12.	Dalbastı kirazında ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	29
Şekil 4.13.	Dalbastı kirazında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.....	30
Şekil 4.14.	Kütahya vişnesinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	31
Şekil 4.15.	Kütahya vişnesinde 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.....	32
Şekil 4.16.	Kaman cevizinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	33
Şekil 4.17.	Kaman cevizinde 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.....	34

Şekil 4.18.	Tombul fındık çeşidinde yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarına ait kallus oluşum oranları.....	35
Şekil 4.19.	Tombul fındık çeşidinde 5 mg/l 2,4-D uygulamasında yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarından oluşan kallusun görünümü..	36
Şekil 4.20.	Kara limonda dişi organ dokularından oluşan kallusların görünümü.....	37
Şekil 4.21.	Kara limonda ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	39
Şekil 4.22.	Kara limonda stile ait kallus oluşum oranları.....	39
Şekil 4.23.	Kara limonda stigmaya ait kallus oluşum oranları.....	40
Şekil 4.24.	Kara limonda ovaryumdan somatik embriyo oluşum oranları.....	41
Şekil 4.25.	Kara limonda stilden somatik embriyo oluşum oranları.....	42
Şekil 4.26.	Kara limonda oluşan somatik embriyoların görünümü.....	42
Şekil 4.27.	Kara limon ovaryumuna ait kallustan indirekt oluşan somatik embriyolar.....	43
Şekil 4.28.	Kara limonda stilden direkt oluşan somatik embriyolar.....	43
Şekil 4.29.	Kara limonda farklı şekillerdeki somatik embriyoların görünümü.....	44

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TEKİRNEZ

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Değiştirilmiş Murashige ve Skoog temel besin ortamının içeriği (Dodds ve Roberts 1993).....	17
Çizelge 3.2.	Temel besin ortamına ilave edilen hormonlar ve dozlarına göre yapılan uygulamalar	18
Çizelge 4.1.	Ankara armudunda ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	19
Çizelge 4.2.	Ekmek ayvasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	22
Çizelge 4.3.	Gloster elmasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.....	24
Çizelge 4.4.	Şekerpare kayısısında ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	26
Çizelge 4.5.	Dalbastı kirazında ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	29
Çizelge 4.6.	Kütahya vişnesinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	31
Çizelge 4.7.	Kaman cevizinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.....	33
Çizelge 4.8.	Tombul fındık çeşidinde yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarına ait kallus oluşum oranları.....	35
Çizelge 4.9.	Kara limonda ovaryum, stil ve stigmaya ait kallus oluşum oranları.....	38
Çizelge 4.10.	Kara limonda ovaryum ve stilden somatik embriyo oluşum oranları	41

1. GİRİŞ

Uyumsuzluk ve kısırlıklar, yoğun genetik açılım ve uzun süren gençlik kısırlığı, melezleme ıslahı başta olmak üzere geleneksel ıslah yöntemlerinin meyve türlerinde kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu durum gen transferi, somatik hibridizasyon, somaklonal varyasyon ve mutasyonlar gibi çoğu *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen modern tekniklerin meyve ıslahında kullanım olanaklarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu tekniklerin başarıya ulaşmasında uygun doku ve yapıların seçiminin önemi büyüktür. Uygun doku ve yapıların seçimi modern tekniklerin yanı sıra geleneksel yöntemlerin esas alındığı ıslah programlarında sürecin kısaltılması amacıyla genetik farklılıkların moleküler teknikler ile belirlenmesi, genetik materyalin muhafazası ve *in vitro* koşullarda hızlı klonal çoğaltım uygulamaları için de önemlidir. Birçok araştırmacı tüm bu çalışmalar için somatik embriyoların çok uygun yapılar olduğunu ifade etmektedir. Günümüzde somatik embriyolar elde edilebildiği ve çoğaltılabildiği meyve türlerinde gen transferi, germplazmaların muhafazası ve *in vitro* klonal çoğaltımda büyük olanaklar sunmaktadır.

Gen transferi, istenilen bir genin bitki hücrelerine aktarılmasıdır. Gen aktarımı virüsler ya da *Agrobacterium* gibi biyolojik vektörler aracılığıyla veya mikro enjeksiyon ve mikro bombardıman gibi teknikler ile gerçekleştirilmektedir (Hansen ve Wright 1999). Birçok çalışma yapılmasına rağmen meyve türleri dahil odunsu bitkilerde gen aktarılmış hücrelerin rejenerasyonu oldukça sınırlıdır. Bu nedenle çalışmalarda önce zigotik embriyolar kullanılmış, ancak daha sonra bu amaçla somatik embriyolar, diğer somatik dokular ile birlikte gen transferinde tercih edilmiştir (Akhtar ve Jain 2000).

Son yıllarda somatik embriyolar ile meyve türlerinde de genetik materyalin muhafaza altına alınması büyük önem kazanmıştır. Sıvı azot içerisinde çok düşük derecelerde muhafaza edilen embriyoların canlılıklarını korumaları, bu tekniği genetik materyalin korunmasında önemli kılmıştır (Akhtar ve Jain 2000).

Doku kültürü çalışmalarında hücrelerde görülen genetik ve fenotipik farklılıklar somaklonal varyasyonlar olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyo ve organ oluşumu

alışmalarında gözlenen varyasyonlar, bir örnek bitki oaltımını sınırlandırırsa da hastalık ve zararlılara dayanım gösteren varyantların gelişmesine olanak sağlamıştır (Karp 2000).

Bazı tropikal meyve türlerinde somatik embriyogenesis protokollerinin başarıyla gerçekleştirilmesi, meyve türlerinin de sentetik tohumla üretilebilme yolunu açmıştır. Somatik embriyolar zigotik embriyolardan farklı olarak endosperm ve tohum kabuğundan yoksundurlar. Bu farklılıkları ortadan kaldırmaya yönelik yapay tohum kaplama tekniğı mevcuttur. Sentetik tohum teknolojisi, tohum retilemediğı durumlarda ya da dştik miktarda elde edildiğinde, zigotik embriyoların canlılık sresinin kısa olduğı tür ve çeşitlerde, vegetatif çoğaltma teknikleri ile oaltımın zorunlu olduğı tür ve çeşitlerde önemlidir (Parrot vd 1993, Bhansali vd 2000).

Birçok tür ve çeşitte yapılan çalışmalarda somatik embriyo oluşumu genotip, eksplant kaynağı, eksplantın alındığı dokunun yaşı ve gelişme durumu, kültür ortamının bileşimi hormon ve organik madde varlığı ve kültür koşullarına bağılı olarak değışmektedir (zcan vd 2001, Litz ve Gray 1992).

Somatik embriyoların oluşumu, çoğaltımı ve imlendirilmesi diğerk türlerde olduğı gibi meyve türlerinde de yoğun ve ayrıntılı çalışmaları gerektirmektedir (Litz ve Gray 1992, Parrot vd 1993, Daigny vd 1996, Aygün ve Dumanoglu 1999, Bhansali vd 2000). Meyve türlerinde somatik embriyo oluşumu ile ilgili olarak zigotik ve somatik dokular kaynak olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte zigotik dokular ana ve babanın ortak karakterlerine sahip bulunduğundan ana genotipin genetik karakterlerinden az ya da çok farklılık göstermektedir. Bu nedenle somatik embriyoların eşey organların döllenmemiş hücre ve somatik dokularından ya da bitkilerin yaprak, kök, gövde gibi diğerk organlarından alınan somatik dokulardan oluşması genetik yapı bakımından önem taşımaktadır. Bu bakımdan önerilen dokulardan eşey organlarının, zigotik embriyo dokularına yakınlıkları nedeniyle somatik embriyo oluşurmaya daha yakın oldukları varsayılmaktadır (Akhtar ve Jain 2000).

Bu çalışmada armut (*Pyrus communis* L. cv "Ankara"), ayva (*Cydonia oblonga* Mill. cv "Ekmek"), elma (*Malus x domestica* Borkh. cv "Gloster"), erik (*Prunus domestica* L. cv "Stanley"), kayısı (*Prunus armeniaca* L. cv "şekerpare"), kiraz (*Prunus avium* L. cv "Dalbastı"), vişne (*Prunus cerasus* L. cv "Kütahya"), ceviz (*Juglans regia* L. "Kaman"), fındık (*Corylus avellana* L. cv "Tombul") ve limon (*Citrus limon* (L.) Burm. cv "Kara limon") genotiplerinde dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

İlk defa havuçta başarının elde edildiği 1958 yılından günümüze kadar birçok bitki türünde somatik embriyo oluşumu ve kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. İlk araştırmalarda eksplant olarak zigotik embriyo dokuları esas alınmıştır. Zigotik embriyoların somatik dokularda olmayan bazı genlere sahip olduğu ve bu genlerin embriyo oluşumunu programladığı düşünülmüştür. Nitekim bu dokulardan hormon içermeyen ortamlarda dahi somatik embriyo meydana geldiği görülmüştür. Bu şekilde potansiyel olarak embriyo oluşturma özelliğinde olan dokular embriyonik dokular olarak ifade edilmiş ve bu dokulara ait hücrelerden somatik embriyoların oluşumu direk somatik embriyogenesis olarak isimlendirilmiştir. Bu dokulardan oluşan kallustan somatik embriyonun meydana gelişi ise indirek somatik embriyogenesis olarak ifade edilmiştir. Somatik embriyo oluşumu üzerine genotipin, eksplantın alındığı dokuların ve bunların fizyolojik özelliklerinin, kültür ortamının ve inkübasyon koşullarının etkili olduğu öne sürülmüştür (Litz ve Gray 1992).

Meyve türlerinde somatik embriyo oluşumu konusunda özellikle 1985 yılından bu yana yoğun olarak çalışıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda genotip, eksplant kaynağı olarak farklı zigotik ya da somatik dokular ve alınma zamanları, ortam bileşimleri, hormonlar, diğer organik bileşikler ve kültür koşulları araştırılmıştır.

2.1. Meyve Türlerinde Zigotik Dokulardan Somatik Embriyo Oluşumu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Tulecke ve McGranahan (1985), ceviz de (*Juglans regia* L.) somatik embriyo oluşumunu sağlamak üzere tam çiçeklenmeden 6-11 hafta sonra olgunlaşmamış kotiledonları, 1.0 mg/l BA (benziladenin) 0.01 mg/l IBA (indolbütirik asit), 2.0 mg/l KIN (kinetin) ve 250 mg/l glutamin ilave ettikleri Driver ve Kuniyuki ortamında 2-4 hafta süreyle kültüre almışlardır. Araştırmacılar somatik embriyo oluşumu için en uygun kotiledon alma zamanının, çeşitlere göre değişmekle beraber tam çiçeklenmeden 7-11 hafta sonra olduğunu, embriyonik kotiledon oranının ise % 10-33 arasında değiştiğini

ve somatik embriyoların bitkiye dönüşümü için 4 °C'de 1-4 hafta süreyle bekletilmesinin iyi sonuç verdiğini bildirmiştir (Tulecke ve McGranahan 1985).

Neuman vd (1993) cevizde (*Juglans nigra* L.) tam çiçeklenmeden 8-23 hafta sonra birer haftalık periyotlar ile alınan olgunlaşmamış kotiledonlardan hazırlanan 1 cm² büyüklüğündeki eksplantları, 1 g/l kasein hidrolizat ve 30 g/l sakaroz içeren Woody Plant Medium (WPM) temel besin ortamında kültüre almışlardır. Eksplantlar önce TDZ (thidiazuron)'nin 0.05 µM (0.01 mg/l), 0.5 µM (0.1 mg/l) ve 5µM (1.1 mg/l) dozlarının 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit)'nin 0.1 µM (0.02 mg/l), 1 µM (0.2 mg/l) ve 10 µM (2.2 mg/l) dozları ile oluşturduğu kombinasyonlarda ve aydınlık koşullarda 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar iki hafta arayla alt kültüre alınmak üzere 11 hafta süreyle hormon içermeyen ortamlarda ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Kültürlerin 15. haftasında yapılan sayımlarda en yüksek somatik embriyo oluşumu 0.05 µM TDZ + 0.1 µM 2,4-D kombinasyonunda tam çiçeklenmeden 8 ve 10 hafta sonra %70, 0.5 µM TDZ + 0.1 µM 2,4-D kombinasyonunda tam çiçeklenmeden 10, 11 ve 12 hafta sonra sırasıyla %78, 75 ve 67 ve 5.0 µM TDZ + 0.1 µM kombinasyonunda tam çiçeklenmeden 8 ve 10 hafta sonra sırasıyla %62 ve 80 olarak kaydedilmiştir (Neuman vd 1993).

De March vd (1993), kirazda (*Prunus avium* L.) olgunlaşmamış ve olgunlaşmış zigotik embriyoların somatik embriyo oluşturma potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında Kuzey Fransa'da 4 farklı ekolojide bulunan ağaçlardan farklı dönemlerde 2.5-4.5 mm büyüklükte alınan zigotik embriyoları önce 10 gün süreyle 18.1 µM (4 mg/l) 2,4-D ve 9.3 µM (2 mg/l) KIN içeren ve daha sonra hormon içermeyen Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamında kültüre almışlardır. Araştırmanın sonunda 2.5-3.5 mm büyüklüğündeki eksplantlardan %2.5 oranında direk somatik embriyo oluşumunu sağlandığı görülmüştür. 2,4-D yerine aynı miktarda NAA (naptalenasetik asit) kullanımının embriyo oluşumunu azalttığı belirtilmiştir (De March vd 1993).

Paul vd (1994) Golden Delicious elma (*Malus x domestica* Borkh.) çeşidinde zigotik embriyoların olgunlaşmamış kotiledonlarından somatik embriyo oluşumu üzerine eksplantın alınma zamanının, karanlık uygulaması, organik bileşiklerin ve şekerin

konsantrasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en iyi sonuçlar 60 günlük zigotik embriyolardan alınan kotiledonlardan %18.3 oranında elde edilmiştir. Adenin, L-glutamin, glisin, yüksek kazein hidrolizat (500 mg/l) ve şeker (60 g/l) konsantrasyonları ve 20 günlük karanlık uygulamasının somatik embriyo oluşumunu artırdığı belirlenmiştir. Bynmeyi düzenleyici madde içermeyen 1/2 kuvvetindeki MS ortamında kültüre alınan ve iki ay süreyle 4°C de soğukta tutulan somatik embriyolarda % 30 oranında rejenerasyon sağlanmıştır.

Onay vd (1995) antepfistiğının (*Pistacia vera* L.) olgunlaşmamış tohumlarından somatik embriyo oluşumu üzerine yürüttükleri çalışmada 200 mg/l kasein hidrolizat, 114 μ M (20 mg/l), 1-askorbik asit ve BA içeren sıvı MS ortamının embriyonik doku ürettiğini belirlemişlerdir. Çalışmada 8.9 μ M (2.0 mg/l) BA içeren sıvı ortamda kültürün 2. haftasında eksplantlardan %20 oranında sıkı yapılı embriyonik kitleler oluşmuştur ve bunların 4.4 μ M (1.0 mg/l) BA içeren ortama transfer edilmesi ile somatik embriyolar meydana gelmiştir.

Daigny vd (1996) "Gloster 69" elma çeşidinde sekonder somatik embriyo oluşumu üzerine etkili olan faktörleri araştırdıkları çalışmada en yüksek somatik embriyo oluşumunu 5.3 μ M (1.0 mg/l) NAA, 0.9 μ M (0.2 mg/l) BA ve 0.9 μ M (0.19 mg/l) KIN kombinasyonundan ve %55.5 oranında elde etmişlerdir. Sadece 10 μ M (2.2 mg/l) TDZ ise %53.3 oranında sekonder somatik embriyo oluşumu sağlamıştır.

Centeno vd (1997) fındıkta (*Corylus avellana* L.) farklı gelişme aşamalarında alınan kotiledonların somatik embriyo oluşturma kapasiteleri ile içsel IAA (indol-3-asetik asit), ABA (absisik asit) ve sitokininlerin (zeatin, zeatin ribosit, dihidrozeatin, dihidrozeatin, dihidrozeatin ribosit, N⁶-isopentenil adenin (iP) ve N⁶-isopentenil adenin ribosit) araştırdıkları çalışmalarında IAA/ABA ve esas olarak iP tip/Z tip sitokinin oranlarının eksplantların embriyonik kapasiteleri için iyi iki indeks olduğunu öne sürmüşlerdir.

Carimi vd (1997), keçi boynuzunda (*Ceratonia siliqua* L.) somatik embriyo oluşumunu 20-25 mm uzunluğundaki ktk baklalardan ayırdıkları döllenmiş ovullerden

sağlamışlardır. Araştırmacılar, 50 g/l sakkaroz, 500 mg/l malt ekstraktı ve 3 mg/l BA içeren MS ortamında embriyonik kallus, 30 g/l sakkaroz, 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında bu kallus dokusundan %16 oranında somatik embriyo ve 20 g/l sakkaroz, 2 mg/l IBA içeren 1/2 kuvvetindeki MS ortamında somatik embriyolarda %12 oranında çimlenme elde etmişlerdir.

Aygün ve Dumanoglu (1999) ayvanın (*Cydonia vulgaris* Pers. cv Limon) olgunlaşmamış kotiledonlarını tam çiçeklenmeden 7, 8, 9, 10 ve 11 hafta sonra 250 mg/l L-glutamin, 500 mg/l kasein hidrolizat, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l BA, 0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l 2,4-D ya da NAA ilave edilmiş makro element ve demir düzeyi ½ olan değiştirilmiş MS ortamında kültüre almışlardır. Kotiledonlar 4 hafta süreyle karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve daha sonra hormon içermeyen aynı bileşimdeki besin ortamında karanlık koşullarda 4'er hafta ara ile 3 kez alt kültüre alınmıştır. En yüksek embriyonik kotiledon oranı (%53.3-80) ve somatik embriyo sayısı (1.07-2.53) 0.0 mg/l BA + 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA + 1 mg/l NAA, 1 mg/l BA + 2 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l BA + 1 mg/l NAA kombinasyonlarında ve tam çiçeklenmeden 7 ve 11 hafta sonra alınan kotiledonlardan elde edilmiştir.

Tang vd (2000) üç vişne (*Prunus cerasus* L.) çeşidinin açıkta tozlanmış meyvelerinin olgunlaşmamış kotiledonlarından somatik embriyo oluşumu üzerine farklı kombinasyonlardaki oksin (2,4-D, NAA, IBA) ve sitokinlerin (KIN ve BA) etkilerini araştırdıkları çalışmalarında temel besin ortamı olarak 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ilave ettikleri MS ortamını kullanmışlardır. Araştırmacılar kültürleri 4 hafta süreyle hormonlu ortamlarda karanlık koşullarda inkübe etmişlerdir. Daha sonra eksplantlar 4'er hafta ara ile içerisinde hormon bulunmayan MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmanın sonunda somatik embriyo oluşumunun vişne çeşitlerinden Scharö'de, Gerema ve Schattenmorelle'ye göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek somatik embriyo oluşumu, Gerema çeşidinde 2 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l IBA+1 mg/l KIN katılan ortamda %10 oranında, Schattenmorelle çeşidinde 4 mg/l 2,4-D+2 mg/l KIN katılan ortamda %6.3 oranında sağlanmıştır. Bu ortamlarda somatik embriyo sayısı çeşitlere göre sırasıyla 10 adet (1. alt kültürde) ve 8 adet (2. alt kültürde) olarak kaydedilmiştir.

2.2. Meyve Türlerinde Somatik Dokulardan Somatik Embriyo Oluşumu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Eşey organları ve nusellar dokulardan somatik embriyo oluşumu ile ilgili çalışmalar

Gill vd (1991) mandarinlerde somatik embriyo oluşumu ile ilgili olarak Kinnow (*Citrus nobilis* x *C. deliciosa*) ve Local Sangtra (*C. reticulata*) çeşitlerinde tohumdan (nusellar embriyolardan) elde edilen genç bitkilerde kotiledon ve epikotil segmentlerini eksplant olarak kullanmışlardır. En yüksek somatik embriyo oluşumu Local Sangtra'da MS ortamında alt kültüre alınan epikotil kallus dokusundan %86.6 oranında ve Kinnow'da Murashige ve Tucker ortamında kültüre alınan epikotil kallus dokusundan %40 oranında elde edilmiştir.

Singh vd (1992), *Citrus meyeri* türüne ait nusellar dokusundan elde edilen kallusu %1.5, 3.0, 4.0, 5.0 laktoz veya %1.0, 2.0, 3.0, 4.0 gliserol ilave ettikleri MS ortamında kültüre almışlardır. Somatik embriyo oluşumu, gliserol uygulamalarında laktoz uygulamalarına göre daha düşük bulunmuş ve özellikle %1 ve 4 gliserol dozları çok kötü sonuç vermiştir. Tüm denemelerde %4 ve 5 laktozun embriyo oluşumunu uyardığı belirlenmiştir.

Chaudhry vd (1993) Kinnow mandarin çeşidinde (*Citrus reticulata*) tohumdan (nusellar embriyolardan) elde edilmiş 18 günlük bitkilerin kotiledonlarından alınan eksplantlardan elde ettikleri embriyonik ve embriyonik olmayan kallus dokularının protein ve peroksidaz aktivitelerini inceledikleri çalışmalarında embriyonik kültürlerde peroksidaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirlemiştir.

Gill vd (1994) çalışmalarında Kinnow mandarininin (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenora) nusellar bitkilerinden elde ettikleri kallusların somatik embriyo oluşturma ve bitkiye dönüşümünü incelemişlerdir. Bu amaçla *in vitro* koşullarda yetiştirilen 3 haftalık genç bitkilerden yaprak, epikotil, kotiledon ve kök segmentlerini almışlardır. Değiştirilmiş Murashige ve Tucker ortamında kültüre alınan tüm

eksplantlarda 1 hafta sonra kallus oluşumu başlamıştır. En fazla kallus oluşumu kotiledonlardan meydana gelmiştir. Somatik embriyo oluşumu için en uygun kallus dokuları ise epikotillerden elde edilmiştir. Embriyonik kalluslar, 3 mg/l BA+0.5 mg/l NAA+500 mg/l malt ekstrakt ilave edilmiş MS ortamında alt kültüre alındığında ileri düzeyde gelişme, büyüme, tomurcuk oluşumu ve somatik embriyolarda çimlenme gözlenmiştir.

Carimi vd (1994), limonda (*Citrus limon* (L.) Burm.) stilden somatik embriyo oluşumu konusunda yaptıkları çalışmada eksplantları 500 mg/l malt ekstraktı, 50 g/l sakkaroz ve 7 g/l agarın yanı sıra 1 mg/l 2,4-D veya 3 mg/l BA ilave edilmiş ya da kontrol amacıyla hormon içermeyen MS temel besin ortamında kültüre almışlardır. Alt kültürler 30 gün ara ile aynı ortamlarda yapılmış ve tüm kültürler 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. İlk kültürlerde iki hafta sonra kallus oluşumu kaydedilen çalışmada en yüksek kallus oluşumu %84.03 ile 2,4-D uygulamasında belirlenmiş, kontrol ve BA uygulamasında ise sırasıyla %33.6 ve %46.2 oranlarında kallus meydana gelmiştir. Her uygulama için 200 adet stilin kültüre alındığı denemelerde BA içeren ortamlardan elde edilen *in vitro* kalluslardan ikinci ve üçüncü aylarda 680 adet, kontrole ait kalluslardan 481 adet embriyo oluşmuş, ancak 2,4-D uygulamasından elde edilen kallus dokularından embriyo oluşumu sağlanamamıştır.

Carimi vd (1995) *Citrus aurantium* L., *C. deliciosa* Tenore, *C. paradisi* Macf. ve *C. sinenensis* (L.) Osb. türlerinde stigma ve stilin birlikte alındığı eksplantları 50 g/l sakkaroz, 500 mg/l malt ekstraktı ve 3 mg/l BA içeren ya da BA içermeyen MS ortamında kültüre almışlardır. Kültürlerin 4. Haftasında stillerin dip kısımlarından kallus oluşumu gözlenmiş ve bu kalluslardan embriyo oluşumu 2-3 ay sonra meydana gelmiştir. En fazla embriyo oluşumu BA ilave edilen ortamlarda kültüre alınan *C. sinenensis* (L.) Osb. cv Sanguinello çeşidinde *in vitro* kallustan 128.1 adet olarak belirlenmiştir. Kallustan ayrılan somatik embriyoların 50 g/l sakkaroz, 500 mg/l malt ekstraktı ve 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamında tam bitkiye dönüşümleri sağlanmıştır.

D'Onghia vd (1997), virus enfeksiyonu görülen Lunario, Femminello Santa Teresa ve Femminello Zagara Bianca limon (*C. limon*) çeşitlerinde virüsten ari bitki eldesinde

somatik embriyoların kullanım olanaklarını araştırmışlardır. Denemelerde bitkisel materyal olarak somatik embriyoların çimlendirilmesi ile elde edilen 18 aylık genç bitkiler esas alınmıştır. Çalışmada, 8 g/l agar, 500 mg/l malt ekstraktı, 3 mg/l BA ve 50 g/l sakkaroz katılan MS besin ortamında üzerinde 16 saat aydınlık koşullarda stil üzerinde gelişen kallus dokusundan elde edilen somatik embriyolar, 500 mg/l malt ekstraktı ve 50 g/l sakkaroz içeren ortam üzerinde çimlendirilmiş, çimlendirme ortamında 2 ay inkübe edilmiş ve daha sonra bitkicikler steril toprak karışımına transfer edilerek %90-100 nem koşullarında 1-2 ay tutulmuş ve son olarak sera koşullarına alınmıştır. Aşılama, mekanik inokülasyon ve serolojik testler ile bu bitkilerin virüs, virüs benzeri ajanlar ve viroidlerden tamamen arınmış olduğu belirlenmiştir.

Carimi vd (1998) Navel grubu portakallarda (*C. sinensis* (L.) Osb) 11 farklı genotipte stigma-stil dokusundan somatik embriyo oluşumunu rapor ettikleri çalışmada eksplantlar 7 g/l agar, 50 g/l sakkaroz ve 500 mg/l malt ekstraktı ilave edilmiş MS temel besin ortamına hormon katılmadan (MS I), 1 mg/l kinetin (MS K) veya 3 mg BA (MS II) katılarak kültüre alınmışlardır. Eksplant ve kalluslar 30 gün arayla alt kültüre alınmış ve 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Embriyonik kalluslar süspansiyon kültürü olarak sıvı MS I veya MS II ortamlarında kültüre alınmış ve kültürler 100 rpm hızla çalışan yatay çalkalayıcılar üzerinde karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Süspansiyon kültürlerde 1-3 ay içerisinde bütün genotiplerde somatik embriyo oluşumları gözlenmiştir. Stigma/stilden somatik embriyo oluşumu en yüksek %18.2 oranında MS II ortamında ve en düşük %9.6 oranında MS I ortamında ortaya çıkmıştır.

Rahman vd (1998) 4 apomiktik elma türünde (*Malus hupehensis*, *M. toringoides*, *M. sikkimensis* ve *M. sargentii*) kotiledon kültürlerinden somatik embriyo oluşumunda, 80 günlük apomiktik embriyoların en yüksek (%43) potansiyele sahip olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada 60 g/l sakkarozun sorbitole göre ve 2.5 g/l gelrite'nin 7 g/l agara göre daha uygun olduğu saptanmıştır.

Carimi vd (1999) farklı *Citrus* türlerinde stigma, stil ve ovaryumun ince hücre tabakalarından (TCL) somatik embriyo oluşumu ve bunların bitkiye dönüşümelerini incelemişlerdir. Dişi organın bu dokuları 0.4-0.5 mm kalınlıkta yatay olarak ince

tabakalar halinde kesilmiş ve 7 g/l agar, 50 g/l sakkaroz içeren 1) Sadece MS, 2) 500 mg/l malt ekstraktı içeren MS (MS I) ya da 3) 500 mg/ l malt ekstraktı ve 3 mg/l BA içeren MS (MS II) olmak üzere 3 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Alt kültürler 30 gün arayla yapılmış ve tüm kültürler 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Dişi organ dokularının ince tabakalar halinde kesildiği (TCL) kültürlerin 4-10. gününden itibaren kallus ve bu kallusların yüzeyinden 2-5 ay sonra somatik embriyo oluşumu başlamıştır. Araştırmacılar bazen görülebilir bir kallus meydana gelmeden de somatik embriyoların oluştuğunu gözlemişlerdir. Kültürlerin 6. ayı tamamlandığında yapılan sayımlar sonucunda genel olarak MS II ortamının iyi sonuç verdiğini ve kültürlerde türlere göre ovaryumun (*C. deliciosa*, *C. tardiva*), stigma ve ovaryumun (*C. madurensis*), stigma ve stilin (*C. limon*, *C. medica*) veya stigmanın (*C. sinensis*) somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada somatik embriyo oluşumuna en yakın tür olarak öne çıkan limonda somatik embriyo oluşumları stigma TCL kültürlerinde MS (%12.6 ve 11.7 adet), MS I (%17.2 ve 11.1 adet), MS II (%42.4 ve 31.3 adet) ortamlarında ve stil TCL kültürlerinde yine MS (%3.8 ve 12.5 adet), MS I (%3.0 ve 15.0 adet), MS II (%5.2 ve 14.0 adet) ortamlarında kaydedilmiştir. Bu türde tam stigmadan MS, MS I ve MS II ortamlarında sırasıyla %26.7, 33.3 ve 73.3, tam stilden ortamlara göre %13.3, 16.7 ve 23.3 oranlarında embriyo oluşumu sağlanmıştır. Diğer *Citrus* türlerinde TCL kültürlerinde somatik embriyo oluşumu ile ilgili en yüksek değerler *C. deliciosa*'da ovaryumda %3.9-5.2 ve 42.0-16.0 adet, *C. madurensis*'de ovaryumda %6.7 ve 30.6 adet, *C. medica*'da stigmada %14.4 ve 38.0 adet, *C. sinensis*'de stigmada %3.3 ve 10.0 adet ve *C. tardiva*'da ovaryumda %9.3 ve 9.4 adet olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar *Citrus* türlerinde dişi organların tam stigma, stil ve ovaryumlarından somatik embriyo oluşumu ile ilgili en yüksek değerleri ise *C. deliciosa*'da %23.3, *C. madurensis*'de %26.7, *C. medica*'da %40.0, *C. sinensis*'de %13.3 ve *C. tardiva*'da %60.0 olarak vermişlerdir.

Fiore vd (2002) *Citrus* türlerinde stigma ve stil dokularının ince tabakalar halinde kesildiği (TCL) kültürlerde somatik embriyo oluşumu üzerine 2,4-D ve 4-CPPU (N-2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea'nun etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada bitkisel materyal olarak limon (*C. limon* (L.) Burm. cv "Femminello") ve portakal (*C. sinensis* (L.) Osb. cv "Washington Navel GS") türleri, temel besin ortamı olarak 50 g/l sakkaroz,

7 g/l agar, 0.0, 0.1, 1.0 ve 3.0 mg/l 2,4-D ve 4-CPPU'nun 16 farklı kombinasyonunu içeren Murashige ve Tucker ortamı esas alınmıştır. Her iki türde de stigma ve stil TCL kültürlerinde 3-5 ay sonra kallus dokusundan somatik embriyoların meydana geldiği görülmüştür. *C. limon*'da stil TCL kültürlerinde embriyo oluşumu %0 (2,4-D içeren ortamlarda) ile %16 (4-CPPU içeren ortamlarda) arasında değişmiştir. Somatik embriyo oluşturma potansiyeli daha yüksek bulunan limonda en iyi sonuçlar stigma TCL kültürlerinde ve özellikle 1 mg/l 4-CPPU ilave edilen ortamlarda %24.8 ile elde edilmiştir.

2.2.2. Diğer somatik dokulardan somatik embriyo oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalar

Gutierrez-Pesce vd (1998) Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) ve Mazzard F12/1 (*P. avium* L.) kiraz anaçlarına gen transferi çalışmaları kapsamında, 1 mg/l BA ve 0.01 mg/l NAA içeren MS besin ortamında sürgün ucu kültürü ile 2 yıl boyunca yapılan alt kültürlerden hazırlanan 1-2 cm uzunluğundaki sürgünlerin orta bölümlerinde 2-3 mm² büyüklüğündeki bir alana yaralama ile *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinin NCPPB 1855 ırkını inoküle etmişlerdir. Araştırmacılar *A. rhizogenes* bakterisinin Colt anacında 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA içeren ortamlarda köklerden somatik embriyo ve sürgün farklılaşmasını uyardığını belirlemişlerdir. Bir sürgüne bağlı olan transgenik köklerde proembriyo ve embriyo sayısı sırasıyla 3-6 ve 6-12 adet arasında değişirken, ayrılmış transgenik köklerde bu değerler 1 ve 0 adet olarak kaydedilmiştir. Sekonder somatik embriyoların da elde edildiği çalışmada bu embriyoların bitkiye dönüşümü çok düşük düzeyde olmuştur. Mazzard F12/1 anacında *A. rhizogenes* bakterisi somatik embriyo oluşumu üzerine etkili olmamıştır.

Mandegaran vd (1999) Colt anacının (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) *in vitro* bitkilerinden ayrılmış kökleri üzerinde somatik embriyoların oluştuğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar 0.33 mg/l BA ve 3.3 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında 10 mm uzunlukta hazırlanan kökler üzerinde ortalama 15 adet ve tam kökler üzerinde 25 adet somatik embriyo oluştuğunu belirlemişlerdir. Tam kökler üzerinde oluşan embriyoların çoğu direkt, kesilmiş kökler üzerindeki ise kallustan indirekt olarak

meydana gelmiştir. Primer somatik embriyolar 0.33 mg/l BA, 2 mg/l IBA ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortama transfer edildiğinde direkt yolla ortalama 2.5 adet/embriyo değerinde sekonder somatik embriyo meydana getirmiştir. Embriyolar, 0.45 mg/l BA ve 1 mg/l GA₃ (Gibberellik asit) ilave edilen ortama alındıklarında %75 oranında sürgün oluşturmuşlardır. Bir çok ortam denenmesine rağmen *P. avium*'un *in vitro* kök ve sürgünlerinden hazırlanan eksplantlar üzerinde somatik embriyo oluşumu sağlanamamıştır.

Michalczuk ve Druart (1999) Inmil® kiraz anacının (*Prunus incisa* x *serrula* "GM9") dışsal hormona gereksinim duymadan meydana gelen ve embriyonik olan kallusu ile *Prunus incisa* x *serrula* ve *Prunus domestica*'nın hormon ile elde edilebilen ve embriyonik olmayan kalluslarında IAA metabolizmasını incelemişlerdir. Araştırmacılar Inmil® kiraz anacının köklerinden elde ettikleri kallusu katılaştırılmış hormonsuz ortamda çoğaltarak bunları hormonsuz sıvı kültüre transfer ettiklerinde somatik embriyoların oluştuğunu gözlemişlerdir. Diğer taraftan *Prunus incisa* x *serrula*'nın yapraklarından ve *P. domestica*'nın yaprak ve köklerinden elde edilen kalluslar devamlı bir gelişme için dışsal oksin uygulamasına gereksinim duymuş ve bunlardan embriyo meydana gelmemiştir. Amid bağlanmış IAA seviyesi kökten elde edilen embriyonik kalluslarda daha yüksek, serbest ve esterleşmiş IAA seviyesi katı ortamda gelişen her iki kallus tipinde de benzer olmuştur. Sıvı ortama transfer etmek, embriyonik olmayan kallusta serbest ve bağlı IAA seviyelerini etkilememiş, fakat embriyonik kallusta amid bağlanmış IAA seviyesi azalmıştır. Seyreltilmiş izotopik ¹³C-IAA'nın ortamdan alınması embriyonik kalluslarda embriyonik olmayanlara göre daha hızlı olmuştur. Bu durum IAA metabolizma hızının embriyonik kallusta daha yüksek olduğunu göstermiştir. *P. domestica*'nın embriyonik olmayan kalluslarında IAA'nın yanı sıra indol-3-ethanol ve indol-3-asetil-N-aspartat da belirlenmiştir. Oysa *Prunus incisa* x *serrula*'nın *in vitro* sürgünlerinde ve embriyonik kallusunda indol-3-asctamid tespit edilmiştir.

D'onofrio ve Morini (2002) gelişme ortamına ilave edilen NaCl ve CaCl₂ konsantrasyonlarının ayva (*Cydonia oblonga* Mill. BA 29 klonu) yapraklarından somatik embriyo ve kök oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, eksplant olarak

in vitro sürgünlerden alınan yapraklar kullanılmıştır. Yapraklar önce iki gün 2.5 mg/l 2,4-D içeren sıvı MS ortamında tutulmuştur. Daha sonra 1.0 mg/l kinetin ve 0.1 mg/l NAA içeren yarı katı MS ortamında 25 gün kırmızı ışık ve 25 gün beyaz ışık altında kültüre alınmıştır. Çalışmada iki deneme planlanmıştır. Birinci denemede 0, 1.5, 3, 6 ve 12 g/l NaCl'ün ve 0.3, 1 ve 3 g/l CaCl₂ ile oluşturduğu kombinasyonlar, ikinci denemede 0, 0.3, 0.6, 1.2 2.4 ve 4.8 g/l NaCl'ün, 0.03, 0.1 ve 0.3 g/l CaCl₂ ile oluşturduğu kombinasyonlar yer almıştır. Embriyonik proses üzerine tuz stresinin faydalı etkilerinin kaydedildiği çalışmada, tuz konsantrasyonlarındaki artışın rejenerasyonu azalttığı ve 3 g/l NaCl ve 1 g/l CaCl₂'ün üzerinde tamamen engellediği belirlenmiştir. CaCl₂'ün 0.03 ve 0.1 g/l dozlarının varlığında 0.3 g/l NaCl, somatik embriyo ve kök oluşumu için uygun bulunmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2002-2003 yıllarında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak armut (*Pyrus communis* L. cv "Ankara"), ayva (*Cydonia oblonga* Mill. cv "Ekmek"), elma (*Malus x domestica* Borkh. cv "Gloster"), erik (*Prunus domestica* L. cv "Stanley"), kayısı (*Prunus armeniaca* L. cv "Şekerpare"), kiraz (*Prunus avium* L. cv "Dalbastı"), vişne (*Prunus cerasus* L. cv "Kütahya"), ceviz (*Juglans regia* L. "Kaman"), fındık (*Corylus avellana* L. cv "Tombul") ve limon (*Citrus limon* (L) Burm. cv "Kara limon") türleri esas alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Eksplantların hazırlanması ve dikimi

Araştırmada eksplant olarak dişi organın stil, stigma ve ovaryumları kullanılmıştır. Fındık ve cevizde dişi organ dokuları, erkek çiçeklerin olgunlaşmasından önce keselere alınmış olan dişi çiçeklerden, diğer türlerde ise çiçek tozları dökülmeye başlamadan önce balon safhasındaki çiçeklerden steril koşullarda alınmıştır. Sterilizasyon için önce çiçekler 1/2 dakika %70'lik etil alkolde bekletilmiş ve ardından 15 dakika %3.75 aktif madde içeren sodyum hipoklorit solusyonunda çalkalanmıştır. Daha sonra sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaştırılması için çiçekler 5'er dakika süreyle 3 kez steril saf su ile çalkalanarak yıkanmıştır. Sterilizasyonu tamamlanmış çiçeklerden çıkarılan dişi organ dokuları laminar kabin içerisinde kesilerek ayrılmıştır. Limon çiçeğinin dişi organlarındaki ovaryum, stil ve stigma iri olduğundan dişi organın bu üç dokusu ayrı olarak, fındıkta dişi çiçekler çok küçük ve birkaçı bir arada bulunduğu için, 1) dokulara zarar vermemek için dişi çiçekler birbirinden ayrılmadan etrafındaki küçük yaprak taslakları ile birlikte, 2) ovaryum, stil, stigma birbirinden ayrılmadan dişi organların ayrı ayrı dikilmesi şeklinde, diğer meyve türlerinde ise ovaryum ayrı, stigmalar çok küçük

ođđđu için stil ile birlikte dikime hazırlanmıştır. Elma, armut ve ayvada ovaryum çiçek tablası ile beraber alınmış ve ortadan ikiye kesilerek ovaryum ortama temas edecek şekilde dikilmiştir. Fındıkta ise dişi organlar bütün olarak kùltùre alınmıştır. Eksplantlar, 100x15 mm boyutlarında olan ve 25 ml katılaştırılmış besin ortamı içeren petrilere yatay pozisyonda dikilmiştir.

3.2.2. Besin ortamı

Çalışmada temel besin ortamı olarak 500 mg/l malt ekstraktı, 50 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ilave edilmiş değiştirilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı esas alınmıştır (Dodds ve Roberts 1993) (Çizelge 3.1). Kontrol olarak değerlendirilen bu ortama ayrıca 1, 3 ve 5 mg/l dozlarda benziladenin (BA) veya 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ilave edilmiştir (Çizelge 3.2). Ortamların pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır.

3.2.3. Kùltür koşulları

Eksplantlar $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda inkùbe edilmiştir. Kahverengileřmeyen ve canlı kalan kùltùrler 8 ay boyunca 4'er hafta ara ile alt kùltùrlere alınmıştır. Elma ve cevizde fenolik bileşikler nedeniyle dikimden sonra birer gün arayla iki kez alt kùltür yapılmıştır. Somatik embriyolar oluştuktan sonra kùltùrler karanlık koşullara alınmıştır.

3.2.4. Veri analizi

Deneme "Tesadùf Parselleri Deneme Düzeneine" göre her tekerrürde 20 eksplant olacak şekilde 10 tekerrürü olarak kurulmuştur. Tüm türlerde kallus ve somatik embriyo oluşum oranları % olarak hesaplanmıştır. İki deneme yılında da kùltùrlerin 2. haftasında oluşmaya başlayan kallusların oluşum oranları 4. haftada; ilk yılında 12. haftada başlayan somatik embriyo oluşumları ise kùltùrlerin 24. haftasında belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Değiştirilmiş Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamının içeriği
(Dodds ve Roberts 1993)

(A) MAKRO ELEMENTLER	Mol (g/mol)	Konsantrasyon (mg/l)
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	160.08	1650
Potasyum nitrat (KNO_3)	202.22	1900
Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	294.06	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	272.08	170
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	493.00	370
(B) DEMİR		
Sodyum-demir EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{FeNa}$)	734.10	36.70
(C) MİKRO ELEMENTLER		
Mangan sülfat monohidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169.01	16
Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	287.575	8.6
Borik asit (H_3BO_3)	61.83	6.2
Potasyum iyodür (KI)	166.01	0.83
Sodyum molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	241.95	0.25
Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	249.69	0.025
Kobalt klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	118.965	0.025
(D) VİTAMİNLER		
Myo-Inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180.16	100
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	75.07	2
Thiamin klorid hidroklorid ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OSxH}_2\text{O}$)	337.3	0.1
Nikotinik asid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	123.11	0.5
Pridoksol hidroklorid ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	205.64	0.5

Somatik embriyo oluşumunda bir yıllık verilerin alınmasının nedeni, denemenin ikinci yılında vejetasyonun geç başlaması dolayısıyla çiçeklenmenin ve eksplantların kültüre alınmasının ilk yıla göre 6 hafta geç kalması ve somatik embriyo oluşumu için gerekli

olan periyodun uzamasıdır. Bulguların analizinde SPSS paket programı kullanılarak ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile %5 hata sınırı esas alınarak saptanmış ve farklı gruplar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Yüzde bulguların açış değerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Temel besin ortamına ilave edilen hormonlar ve dozlarına göre yapılan uygulamalar

Uygulama No	Uygulamalar *
1	Kontrol
2	1 mg/l BA
3	3 mg/l BA
4	5 mg/l BA
5	1 mg/l 2,4-D
6	3 mg/l 2,4-D
7	5 mg/l 2,4-D

* Tüm uygulamalarda temel besin ortamı olarak 500 mg/l malt ekstraktı, 50 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ilave edilmiş değiştirilmiş Murashige ve Skoog ortamı esas alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Armutta Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Denemenin her iki yılında da Ankara armudunun kültüre alınan dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Kültürlerde stil ve stigmalar canlılıklarını kaybederek kahverengileşirken, ovaryum + çiçek tablası dokularından kallus meydana gelmiştir (çizelge 4.1., şekil 4.1. - 4.4.). Kallus, BA uygulamalarında saydam ve sulu (şekil 4.2. ve 4.4.), 2,4-D uygulamalarında ise beyaz ve pamuğa benzer bir yapıda (şekil 4.3.) oluşmuştur. Kallus oluşumu kontrol uygulamasında yıllara göre sırasıyla %27 ve %23 oranlarında meydana gelmiş ve bu değerler hormon uygulamalarına göre istatistik olarak önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur. En yüksek kallus oluşum oranları 2,4-D uygulamalarında ortaya çıkmıştır. Denemenin ilk yılında bu hormonun tüm dozlarında %100'e ulaşan kallus oluşum oranı, ikinci yılda %82.5-%93.8 arasında değişmiştir. İkinci yılda bu oran, 2,4-D'nin 1 ve 3 mg/l lik dozlarında bu oran 5 mg/l'ye göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. BA uygulamalarında ise denemenin ilk yılında %62.5-72 olan kallus oluşum oranı, ikinci yılda %45.5-62.5 arasında kaydedilmiştir. Kallus oluşum oranları bakımından uygulama dozları arasındaki farklılıklar genellikle istatistik olarak önemli bulunmamıştır (çizelge 4.1.).

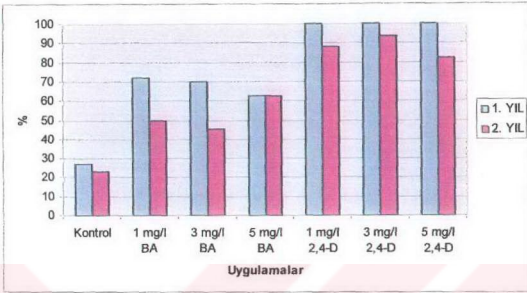
Çizelge 4.1. Ankara armudunda ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR [*]	1. YIL	2. YIL
1	Kontrol	%27 (30) ^{**} c ^{***}	%23 (28.5) d
2	1 mg/l BA	%72 (58.7) b	%50 (45.1) c
3	3 mg/l BA	%70 (57.3) b	%45.5 (42.4) c
4	5 mg/l BA	%62.5 (52.4) b	%62.5 (52.5) c
5	1 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%88 (76.8) ab
6	3 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%93.8 (81.2) a
7	5 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%82.5 (68.6) b

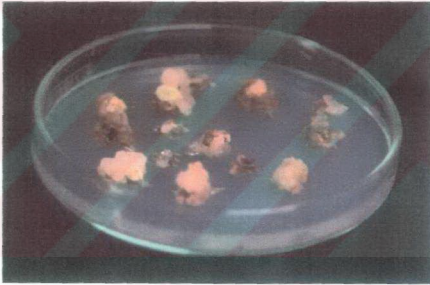
^{*} Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

^{**} Parantez içindeki rakamlar % bulguların açış değeri karşılıklarıdır.

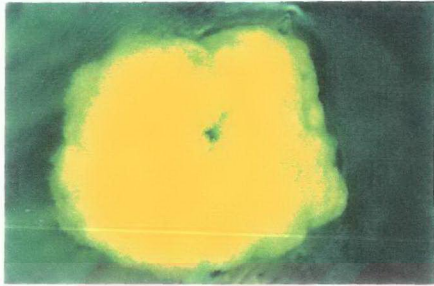
^{***} Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



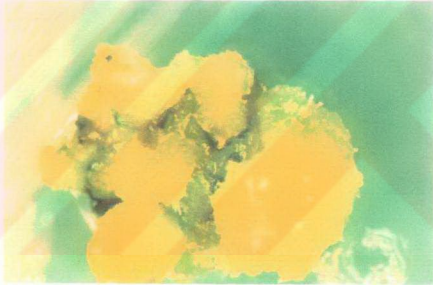
Şekil 4.1. Ankara armudunda ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.2. Ankara armudunda 3 mg/l BA uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusların görünümü.



Şekil 4.3. Ankara armudunda 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görüntüsü.



Şekil 4.4. Ankara armudunda 3 mg/l BA uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görüntüsü

4.2. Ayvada Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Ekmek ayvasının dişi organ dokularından iki yıl süresince somatik embriyo oluşmamıştır. Stil ve stigma dokuları ilk ay içerisinde kahverengileşerek canlılıklarını kaybederken ovaryum + çiçek tablasından 2,4-D uygulanan kültürlerde kallus oluşumu gözlenmiştir (çizelge 4.2., şekil 4.5. ve 4.6.). Kalluslar yeşilimsi beyaz ve kısmen sert yapıda oluşmuştur (şekil 4.5.). 2,4-D uygulamalarında denemenin ilk yılında %22.5-30 arasında değişen kallus oluşum oranı ikinci yılda %72-74.5 olarak kaydedilmiştir. Bu bakımdan 2,4-D'nin uygulama dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Kontrol ve BA uygulamalarında ise kallus oluşumu gözlenmemiştir (çizelge 4.2.).

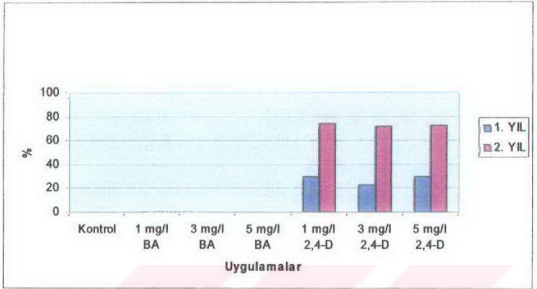
Çizelge 4.2. Ekmek ayvasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%0	(0)	b ^{***}	%0	(0)	b
2	1 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
3	3 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
4	5 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
5	1 mg/l 2,4-D	%30	(33)	a	%74.5	(60.1)	a
6	3 mg/l 2,4-D	%22.5	(27.9)	a	%72	(63.4)	a
7	5 mg/l 2,4-D	%30	(33)	a	%73	(60.1)	a

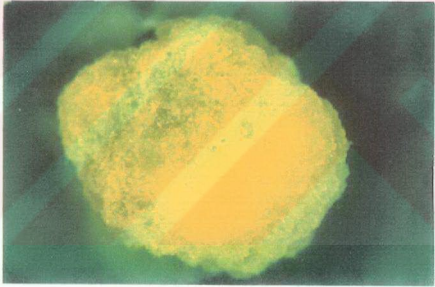
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

** Parantez içindeki rakamlar % bulguların açılış değeri karşılıklarıdır.

*** Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.5. Ekmek ayvasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.6. Ekmek ayvasında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.

4.3. Elmada Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumunun gözlenmediği Gloster elma çeşidinde stil ve stigmalar kültürlerin ilk bir ayında kahverengileşerek, canlılıklarını kaybetmiştir. Ovaryum + çiçek tablası dokularından 2,4-D uygulanan kültürlerde ikinci haftadan itibaren kalluslar oluşmaya başlamıştır. Kallusların beyaz-yeşil renkte ve sulu yapıda oldukları gözlenmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı 1 mg/l 2,4-D uygulamasında (%54 ve %68.7) kaydedilmiştir. Kontrol ve BA uygulamalarında ise kallus oluşumu meydana gelmemiştir (çizelge 4.3, şekil 4.7 ve 4.8). BA uygulanan kültürlerde ovaryum + çiçek tabyası dokuları kahverengileşmemiş ve canlılıklarını sürdürmüştür.

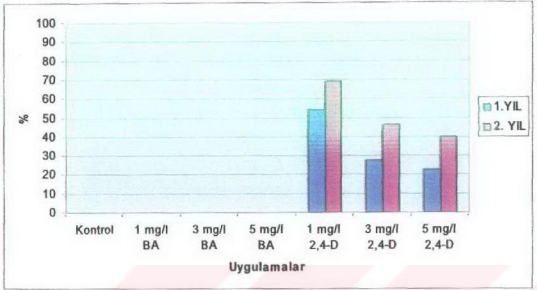
Çizelge 4.3. Gloster elmasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%0	(0)**	b***	%0	(0)	b
2	1 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
3	3 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
4	5 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
5	1 mg/l 2,4-D	%54	(47.3)	a	%68.7	(56.4)	a
6	3 mg/l 2,4-D	%27.5	(31)	b	%46.3	(42.7)	b
7	5 mg/l 2,4-D	%22.5	(21)	b	%21.3	(20)	c

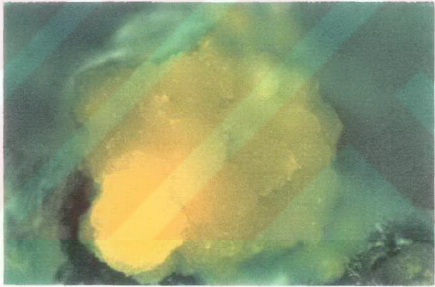
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

** Parantez içindeki rakamlar % bulguların açılış değeri karşılıklarıdır.

*** Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.7. Gloster elmasında ovaryum + çiçek tablası dokusuna ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.8. Gloster elmasında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryum + çiçek tablası dokusundan oluşan kallusun görünümü.

4.4. Erikte Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Stanley erik çeşidinde stil, stigma ve ovaryumlardan her iki deneme yılında da somatik embriyo ve kallus oluşumu meydana gelmemiştir. Eksplantların tamamı kültüre alındıktan 2-3 hafta sonra kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmiştir.

4.5. Kayısıda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Şekerpare kayısının dişi organ dokularından somatik embriyo oluşmamıştır. Stil ve stigmaları kültürlerin ilk ayında kahverengileşerek canlılıklarını kaybederken, kontrol ve 2,4-D içeren ortamlarda ikinci haftadan itibaren ovaryumlardan kalluslar oluşmaya başlamıştır. Kallusların beyaz-kahverengimsi ve yumuşak yapıda oldukları gözlenmiştir. Alt kültürlerde kallus oluşumu artmıştır. En yüksek kallus oluşum oranı (%51 ve %47.4), her iki deneme yılında da 1 mg/l 2,4-D uygulamasında kaydedilmiştir (çizelge 4.4., şekil 4.9. ve 4.10.). BA uygulamalarında ovaryumdan kallus oluşmamıştır.

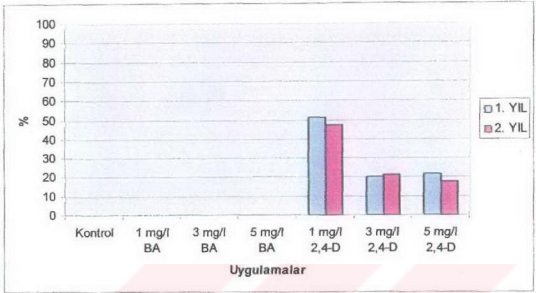
Çizelge 4.4. Şekerpare kayısında ovaryuma ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%32.5	(34.6)	^{ab}	%12.5	(20.8)	c
2	1 mg/l BA	%0	(0)	d	%0	(0)	d
3	3 mg/l BA	%0	(0)	d	%0	(0)	d
4	5 mg/l BA	%0	(0)	d	%0	(0)	d
5	1 mg/l 2,4-D	%51	(45.7)	a	%47.4	(46.1)	a
6	3 mg/l 2,4-D	%20	(26.4)	c	%21.2	(27.2)	b
7	5 mg/l 2,4-D	%21.5	(27.5)	c	%17.5	(22.8)	bc

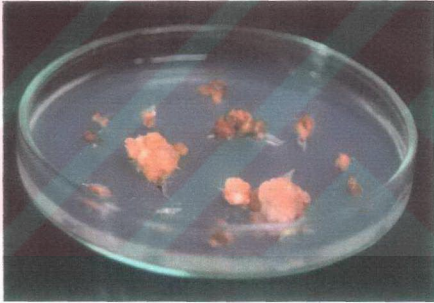
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

^{**} Parantez içindeki rakamlar % bulguların açış değeri karşılıklarıdır.

^{***} Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.9. Şekerpare kayısısında ovaryuma ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.10. Şekerpare kayısısında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.



Şekil 4.11. Şekerpare kayısısında ovaryumdan kallus oluşumu.

4.6. Kirazda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Dalbastı kirazında dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Stil ve stigmalar kuruyarak canlılıklarını kaybederken, kültürlerin ikinci haftasından itibaren bazı BA ve 2,4-D uygulamalarında ovaryumdan kallus oluşumu başlamıştır (çizelge 4.5., şekil 4.12. ve 4.13.). Oluşan kallusların beyaz renkte, yumuşak ve sulu bir yapıda olduğu gözlenmiştir. BA'nın 3 mg/l (%35 ve %32.5) ve 2,4-D'nin 1 mg/l (%44 ve %40.6) dozlarında her iki yılda da yüksek oranda kallus oluşumu kaydedilirken, BA'nın 5 mg/l (%14) ve 2,4-D'nin 3 mg/l (%19) dozlarında sadece ikinci yılda ve düşük oranlarda kallus oluşumu belirlenmiştir (çizelge 4.5., şekil 4.12. ve 4.13.).

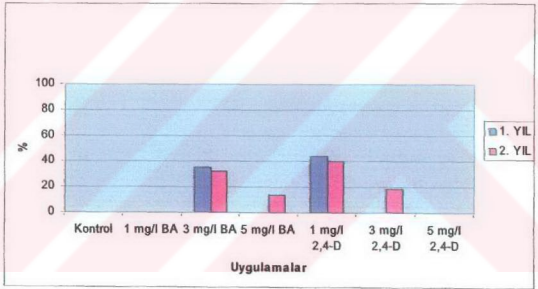
Çizelge 4.5. Dalbastı kirazında ovaryuma ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR [*]	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%0	(0)	d ^{***}	%0	(0)	d
2	1 mg/l BA	%0	(0)	d	%0	(0)	d
3	3 mg/l BA	%35	(36.1)	b	%32.5	(34.4)	b
4	5 mg/l BA	%0	(0)	d	1%4	(21.5)	c
5	1 mg/l 2,4-D	%44	(41.6)	a	%40.6	(39.4)	a
6	3 mg/l 2,4-D	%0	(0)	d	%19	(25.3)	c
7	5 mg/l 2,4-D	%0	(0)	d	%0	(0)	d

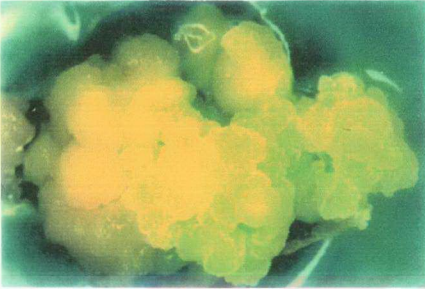
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

^{**} Parantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklarıdır.

^{***} Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.12. Dalbastı kirazında ovaryuma ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.13. Dalbastı kirazında 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.

4.7. Vişnede Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Kütahya vişnesinin dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Kültürlerin ikinci haftasından itibaren kontrol ve 1 mg/l BA uygulamasının dışında tüm BA ve 2,4-D uygulamalarında ovaryumlardan kallus oluşumu başlamıştır. 3 ve 5 mg/l BA uygulamalarında kallus oluşumu %4-5 düzeyinde kahrken, özellikle 1 ve 3 mg/l 2,4-D uygulamalarında %28-50 oranlarında kallus oluşumu belirlenmiştir. Bu bulgular istatistiksel olarak diğer uygulamalara ait değerlerden önemli düzeyde daha yüksek olmuştur (çizelge 4.6., şekil 4.14. ve 4.15.). Kütahya vişnesinde de stil ve stigmalarından kallus oluşmamış, bunlar kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir.

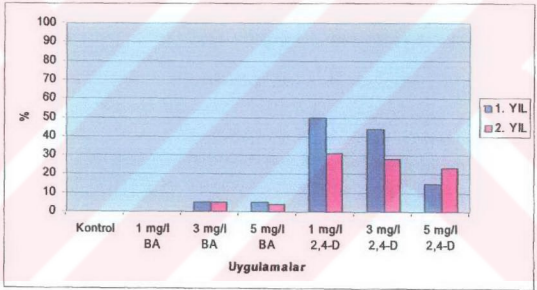
Çizelge 4.6. Kütahya vişnesinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%0	(0)	c ^{***}	%0	(0)	c
2	1 mg/l BA	%0	(0)	c	%0	(0)	c
3	3 mg/l BA	%5	(6.7)	c	%5	(8.5)	b
4	5 mg/l BA	%5	(6.7)	c	%4	(6.4)	bc
5	1 mg/l 2,4-D	%50	(40.8)	a	%31	(34.1)	a
6	3 mg/l 2,4-D	%44	(41.5)	a	%28	(31.6)	a
7	5 mg/l 2,4-D	%15	(22.5)	b	%23	(28.1)	a

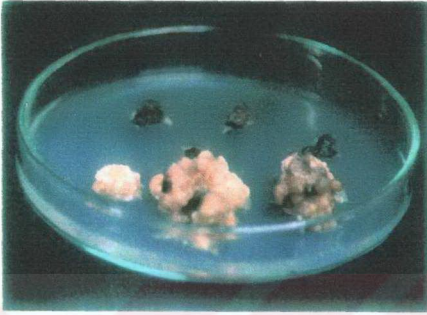
*rtam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

** arantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklardır.

*** Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.14. Kütahya vişnesinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.15. Kütahya vişnesinde 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görüntüsü.

4.8. Cevizde Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Kaman cevizi ovaryumlarının kültüre alındıktan sonra fenolik bileşikler salgıladıkları gözlenmiş ve birer gün arayla iki kez alt kültüre alınmıştır. Stil ve stigmalar siyahlaşarak canlılıklarını kaybetmiştir. Ovaryumların ise kültür ortamında şişmesi sonucu boyutları artış göstermiş ve aynı zamanda kahverengi kallus oluşturmuştur.

Her iki yılda da Kaman cevizinin stil, stigma ve ovaryumlarından somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Sadece ovaryumdan gelişen kallusta en yüksek oranlar BA'nın 3 mg/l (%56.5 ve %51) ve 5 mg/l (%46.5 ve %41) dozları ile 2,4-D'nin 1 mg/l (%42.5 ve %37.5) dozunda kaydedilmiştir (çizelge 4.7., şekil 4.16. ve 4.17.). BA'nın 1 mg/l dozunda kallus oluşum oranı (%16) diğer uygulamalardan önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur. Kontrol ve 2,4-D'nin 3 mg/l ve 5 mg/l dozlarında kallus oluşum oranı %24 ile %30 arasında değişmiştir. Bunlar arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (çizelge 4.7.).

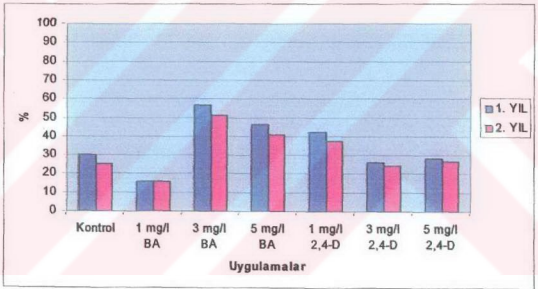
Çizelge 4.7. Kaman cevizinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL			2. YIL		
1	Kontrol	%30	(33.9)	c***	%25	(29.8)	c
2	1 mg/l BA	%16	(23.3)	d	%16	(23.3)	d
3	3 mg/l BA	%56.5	(48.9)	a	%51	(45.7)	a
4	5 mg/l BA	%46.5	(43.6)	ab	%41	(40)	b
5	1 mg/l 2,4-D	%42.5	(40.6)	b	%37.5	(37.7)	b
6	3 mg/l 2,4-D	%26	(30.4)	c	%24	(29)	c
7	5 mg/l 2,4-D	%28	(31.4)	c	%26.7	(30.7)	c

Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

** Parantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklardır.

*** Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.16. Kaman cevizinde ovaryuma ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.17. Kaman cevizinde 1 mg/l 2,4-D uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü.

4.9. Fındıkta Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Tombul fındıkta kültüre iki şekilde alınan eksplantlardan (bakınız Materyal ve Metod 3.1) somatik embriyo meydana gelmemiştir. Sadece dişi organların yer aldığı kültürlerde eksplantlar tamamen kahverengileşip canlılıklarını kaybederken, etrafındaki yaprak taslakları ile birlikte birkaçı bir arada dikilen dişi çiçek eksplantlarında tüm uygulamalarda kallus oluşumu gözlenmiştir (çizelge 4.8., şekil 4.18.). En yüksek kallus oluşum oranı denemenin ilk yılında 1 mg/l 2,4-D uygulamasından (%35.8) elde edilirken, ikinci yılda 2,4-D'nin tüm uygulamaları aynı istatistik grupta ve %22.6-30.6 arasında değişen oranlarda kallus oluşumu sağlamıştır (şekil 4.19.). Kontrolde sadece %1.6 oranında kaydedilen kallus oluşum oranı BA'nın düşük dozlarında %0-6 arasında değişmiştir (çizelge 4.8.).

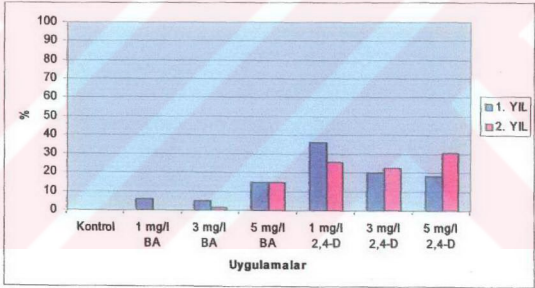
Çizelge 4.8. Tombul fındık çeşidinde yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarına ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	1. YIL	2. YIL
1	Kontrol	%1.6 (4.3) ^{ab} d ^{***}	%1.6 (3.7) c
2	1 mg/l BA	%6 (14) c	%0 (0) c
3	3 mg/l BA	%5 (11.6) c	%1.6 (4.3) c
4	5 mg/l BA	%15 (22.9) b	%15 (21) b
5	1 mg/l 2,4-D	%35.8 (36.7) a	%25.6 (30) a
6	3 mg/l 2,4-D	%20 (26.5) b	%22.6 (28) a
7	5 mg/l 2,4-D	%18 (25.1) b	%30.6 (32.4) a

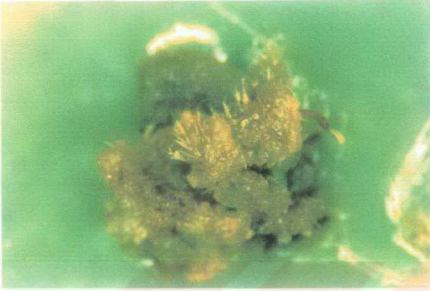
*Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

** Parantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklardır.

*** Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



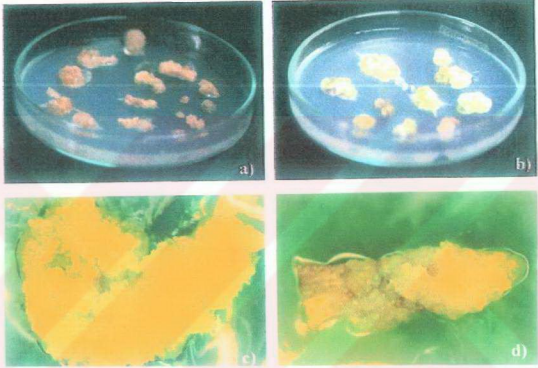
Şekil 4.18. Tombul fındık çeşidinde yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarına ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.19. Tombul fındık çeşidinde 5 mg/l 2,4-D uygulamasında yaprak taslakları + dişi organ eksplantlarından oluşan kallusun görünümü.

4.10. Limonda Somatik Embriyo ve Kallus Oluşumu

Kara limonda dişi organ dokularının tümünde kültürlerin 2. Haftasından itibaren kallus oluşumu kaydedilmiştir. Kallusların 2,4-D uygulamalarında beyaz-yeşilimsi renkte, sert ve camsı yapıda, BA uygulamalarında ise krem-kahverenginde, yumuşak ve sulu yapıda oldukları gözlenmiştir (şekil 4.20.).



Şekil 4.20. Kara limonda dişi organ dokularından oluşan kallusların görünümü.

- a) 3 mg/l BA uygulamasında oluşan kallusların görünümü
- b) 1 mg/l 2,4-D uygulamasında oluşan kallusların görünümü
- c) 3 mg/l BA uygulamasında ovaryumdan oluşan kallusun görünümü
- d) 3 mg/l BA uygulamasında stilden oluşan kallusun görünümü

Ovaryumda, denemenin ilk yılında kontrol, BA ve 2,4-D'nin tüm uygulamalarında %100 oranında kallus oluşumu belirlenmiştir. Kallus oluşum oranı ikinci yılda uygulamalara göre farklılık göstermiş ve en yüksek oranlar (%100) 2,4-D uygulamalarında kaydedilmiştir. BA uygulamalarında %94-96 arasında olan bu oran kontrolde %54 olarak belirlenmiştir (çizelge 4.9., şekil 4.20.c ve 4.21.).

Stilde, ilk yıl BA'nın tüm uygulamaları ile 2,4-D'nin 1 mg/l dozunda kallus oluşum oranı %100 olmuştur. 2,4-D'nin 3 ve 5 mg/l dozlarında %91 ve 98 olan bu değer kontrolde %87 olarak kaydedilmiştir. İkinci yılda kontrolde %40 olan kallus oluşum oranı BA ve 2,4-D uygulamalarının tümünde yüksek oranlarda ve aralarında istatistiksel bakımdan önemli bir farklılık olmaksızın %87-100 arasında belirlenmiştir (çizelge 4.9, şekil 4.20d ve 4.22).

Stigmada, ilk yıl tüm uygulamalarda kallus oluşum oranı %17-34 arasında değişmiştir. Bu değerler aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır. İkinci yılda ise kallus oluşum oranı istatistiksel olarak önemli bir farklılıkla en yüksek (%46) 3 mg/l BA uygulamasında saptanmıştır. Bu yılda kallus oluşum oranı en düşük kontrolde (%11) kaydedilmiştir (çizelge 4.9, şekil 4.23).

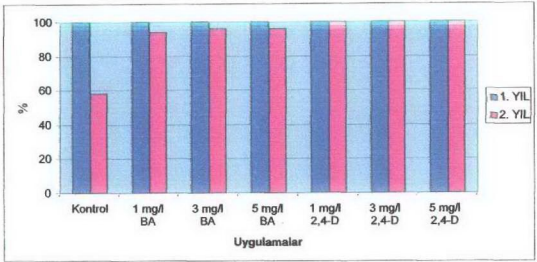
Çizelge 4.9. Kara limonda ovaryum, stil ve stigmaya ait kallus oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR*	OVARYUM	STİL	STİGMA
		1. YIL		
1	Kontrol	%100 (90) ^{***} a ^{***}	%87 (76.4) b	%34 (32) a
2	1 mg/l BA	%100 (90) a	%100 (90) a	%26 (30.5) a
3	3 mg/l BA	%100 (90) a	%100 (90) a	%28 (30) A
4	5 mg/l BA	%100 (90) a	%100 (90) a	%21 (26.8) A
5	1 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%100 (90) a	%24 (23.7) A
6	3 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%91 (80.8) ab	%22 (28.1) A
7	5 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%98 (83.9) ab	%17 (21.7) A
		2. YIL		
1	Kontrol	%54 (50) ^{***} c ^{***}	%40 (39.2) b	%11 (15.3) c
2	1 mg/l BA	%94 (81) b	%91 (80.7) a	%23 (28.3) b
3	3 mg/l BA	%96 (85) ab	%87 (76) a	%46 (42.7) a
4	5 mg/l BA	%96 (84.9) ab	%100 (90) a	%27 (30.9) b
5	1 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%91 (75) a	%25 (30) b
6	3 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%87 (75.9) a	%26 (30.4) b
7	5 mg/l 2,4-D	%100 (90) a	%96 (84.4) a	%24.5 (29) b

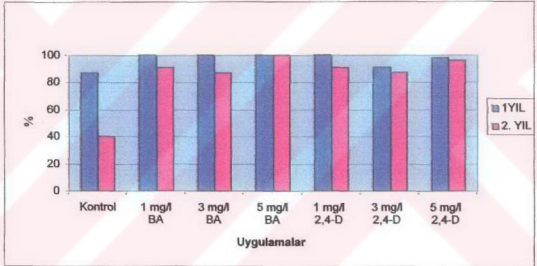
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

^{**} Parantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklarıdır.

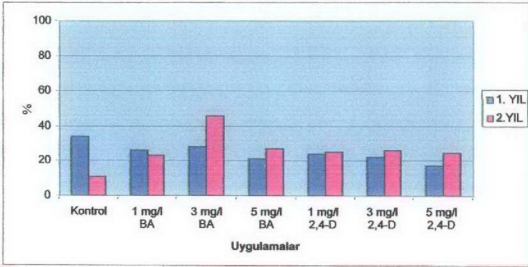
^{***} Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.21. Kara limonda ovaryuma ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.22. Kara limonda stile ait kallus oluşum oranları.



Şekil 4.23. Kara limonda stigmaya ait kallus oluşum oranları.

Bu çalışmada somatik embriyo oluşumu sadece limonda kaydedilmiştir. Kaba limonda kültürlerin 12. haftasından itibaren ovaryum ve stillerden sadece 5 mg/l BA içeren ortamlarda embriyolar oluşmaya başlamıştır (çizelge 4.10, şekil 4.24, 4.25 ve 4.26). Embriyolar kallustan indirek (şekil 4.27) ya da ovaryum ve stilden direk (şekil 4.28) oluşmuştur. Ovaryumların %21'i ve stillerin %23.5'i direk ve indirek yollardan somatik embriyo oluşturmuştur (çizelge 4.10). Embriyoların farklı şekillerde olduğu görülmüştür (şekil 4.26, 4.27, 4.28, 4.29).

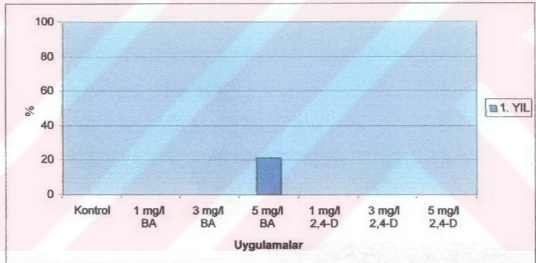
Çizelge 4.10. Kara limonda ovaryum ve stilden somatik embriyo oluşum oranları

NO	UYGULAMALAR ^a	OVARYUM			STİL		
		1. YIL					
1	Kontrol	%0	(0) ^{ab}	b ^{abc}	%0	(0)	b
2	1 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
3	3 mg/l BA	%0	(0)	b	%0	(0)	b
4	5 mg/l BA	%21	(16)	a	%23.5	(17.5)	a
5	1 mg/l 2,4-D	%0	(0)	b	%0	(0)	b
6	3 mg/l 2,4-D	%0	(0)	b	%0	(0)	b
7	5 mg/l 2,4-D	%0	(0)	b	%0	(0)	b

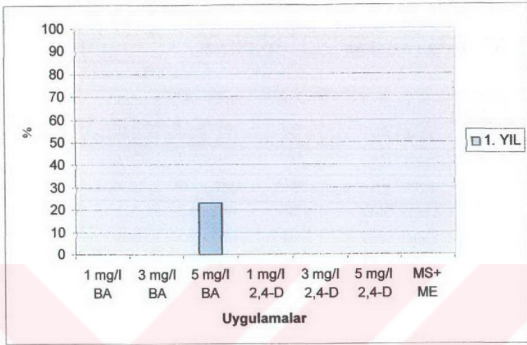
Ortam olarak 500 mg/l malt ekstraktı katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır.

^{**} Parantez içindeki rakamlar % bulguların aç değeri karşılıklardır.

^{***} Harfler, uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



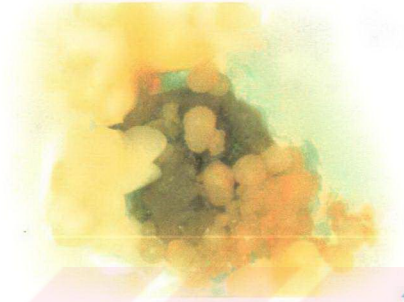
Şekil 4.24. Kara limonda ovaryumdan somatik embriyo oluşum oranları.



Şekil 4.25. Kara limonda stilden somatik embriyo oluşum oranları.



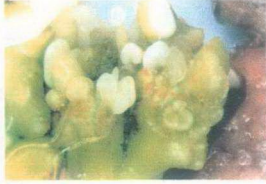
Şekil 4.26. Kara limonda oluşan somatik embriyoların görünümü



Şekil 4.27. Kara limon ovaryumuna ait kallustan indirekt oluşan somatik embriyolar.



Şekil 4.28. Kara limonda stilden direkt oluşan somatik embriyolar.



Şekil 4.29. Kara limonda farklı şekillerdeki somatik embriyoların görünümü.

5. TARTIŖMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bazı meyve türlerinde dişi organ dokularından stigma, stil ve ovaryumdan somatik embriyo ve kallus oluşunu üzerine benziladenin ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit dozlarının etkileri incelenmiştir.

Literatürde somatik embriyo oluşunu konusunda yapılmış çalışmalarda eksplant kaynağı olarak farklı dokular kullanılmışsa da bir çok türde olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış kotiledonlar başta olmak üzere zigotik embriyo dokuları esas alınmıştır. Zigotik embriyoların somatik dokularda olmayan bazı genlere sahip olduğı ve bu genlerin embriyo oluşumunu programladığı dşnlmştir. Nitekim bu dokulardan hormon ermeyen ortamlarda dahi somatik embriyo meydana geldiğı grlmştir (Litz ve Gray 1992). Meyve türlerinde de somatik embriyo oluşunu ve çoğaltımı ile ilgili başarılı sonuçlar genellikle zigotik embriyolara ait dokulardan elde edilmiştir (Tulecke ve McGranahan 1985, Neuman vd 1993, De March vd 1993, Paul vd 1994, Onay vd 1995, Daigny vd 1996, Centeno vd 1997, Carimi vd 1997, Aygün ve Dumanoglu 1999, Tang vd 2000). Bununla birlikte meyve türleri gibi döllenmiş tohum ve tohum dokuları ile çoğaltıldığında genetik yapısı geniş açılım gösteren türlerde ana genotipin karakterlerinden uzaklaşılmaması açısından somatik embriyo somatik dokuların eksplant olarak kullanılması gerekmektedir. Meyve türlerinde somatik dokulardan yaprak, sürgün ve kök gibi vegetatif dokuların embriyo oluşturma başarısı oldukça düşüktür (Gutierrez-Pesce vd 1998, Mandegaran vd 1999, Michalczuk ve Druart 1999, D'onoerio ve Morini 2002). Bununla birlikte *Citrus* türleri başta olmak üzere stigma, stil, ovaryum ve nusellar dokular gibi zigotik olmayan eşey organ dokularına ait somatik dokulardan ise başarılı sonuçlar alındığı rapor edilmektedir (Gill vd 1991, Singh vd 1992, Chandhry vd 1993, Gill vd 1994, Carimi vd 1994 ve 1995, D'Onghia vd 1997, Carimi vd 1998, Carimi vd 1999, Fiore vd 2002). Bu durumu Akhtar ve Jain (2000) eşey organlarının, zigotik embriyo dokularına yakınlıkları nedeniyle somatik embriyo oluşturmaya daha yatkın olduklarının varsayıldığı şeklinde açıklamaktadır. Bu görüşten yola çıkılarak çalışmamızda da armut, ayva, elma, erik, kayısı, kiraz, vişne, ceviz, fındık ve limonda dişi organ dokuları stigma, stil ve ovaryumdan somatik embriyo oluşunu incelenmiştir.

Denemenin her iki yılında da Kara limon dışında Ankara armudu, Ekmek ayvası, Gloster elması, Stanley eriği, Şekerpare kayısı, Dalbastı kirazı, Kütahya vişnesi, Kaman cevizi ve Tombul fındık çeşitlerinde dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Bu türlerden limon dışındakilerde somatik embriyo oluşumunda eksplant olarak stigma, stil ve ovaryumun kullanıldığı bir çalışma ile literatürde karşılaşılmamıştır. Bununla birlikte sınırlı sayıda da olsa ayva, elma, kiraz, vişne ve cevizde farklı dokulardan somatik embriyo oluşumu ile ilgili veriler bulunmaktadır. Aygün ve Dumanoglu (1999) ayvanın (*Cydonia vulgaris* Pers. cv Limon) olgunlaşmamış kotiledonlarından %53.3-80 oranında ve 1.07-2.53 adet/eksplant sayıda somatik embriyo elde ederken, D'onofrio ve Morini (2002) ayvada (*Cydonia oblonga* Mill. BA 29 klonu) 0.03 ve 0.1 g/l dozlarında $CaCl_2$ 'ün varlığında 0.3 g/l NaCl'ün somatik embriyo ve kök oluşumu için uygun bulunduğunu bildirmişlerdir. Paul vd (1994) Golden Delicious elma (*Malus x domestica* Borkh.) çeşidinde en iyi sonuçları 60 günlük zigotik embriyolardan alınan kotiledonlardan %18.3 oranında, Daigny vd (1996) "Gloster 69" elmasında %55.5 oranında elde etmişlerdir. Rahman vd (1998) 4 apomiktik elma türünde (*Malus hupehensis*, *M. toringoides*, *M. sikkimensis* ve *M. sargentii*) 80 günlük apomiktik embriyolar kullanılarak yapılan kotiledon kültürlerinin %43 oranında somatik embriyo oluşturma potansiyeline sahip bulunduğunu belirlemişlerdir. De March vd (1993), kirazda (*Prunus avium* L.) olgunlaşmamış ve olgunlaşmış zigotik embriyolardan 2.5-3.5 mm büyüklüğündeki eksplantlardan %2.5 oranında direkt somatik embriyo oluşumunu sağlamışlardır. Gutierrez-Pesce vd (1998) Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) ve Mazzard F12/1 (*P. avium* L.) kiraz anaçlarında bir sürgüne bağlı olan transgenik köklerde oluşan proembriyo ve embriyo sayısını sırasıyla 3-6 ve 6-12 adet, ayrılmış transgenik köklerde 1 ve 0 adet olarak bildirmişlerdir. Mandegaran vd (1999) Colt anacının (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) *in vitro* bitkilerinden ayrılmış 10 mm uzunluğundaki kökler üzerinde ortalama 15 adet ve tam kökler üzerinde 25 adet somatik embriyo oluştuğunu belirlemişlerdir. Tam kökler üzerinde oluşan embriyoların çoğu direkt, kesilmiş kökler üzerindikiler ise kallustan indirekt olarak meydana gelmiştir. Primer somatik embriyolar 0.33 mg/l BA, 2 mg/l IBA ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortama transfer edildiğinde direkt yolla ortalama 2.5 adet/embriyo değerinde sekonder somatik embriyo meydana getirmiştir. Michalczuk ve Druart (1999) Inmil® kiraz anacının (*Prunus incisa*

x serrula "GM9") köklerinden elde ettikleri kallustan somatik embriyoların oluştuğunu gözlemişlerdir. Tang vd (2000) üç vişne (*Prunus cerasus* L.) çeşidinin açıkta tozlanmış meyvelerinin olgunlaşmamış kotiledonlardan en yüksek somatik embriyo oluşumunu Gerema çeşidinde %10, Schattenmorelle çeşidinde %6.3 oranında sağlanmışlardır. Bu ortamlarda somatik embriyo sayısı çeşitlere göre sırasıyla 10 adet (1. alt kültürde) ve 8 adet (2. alt kültürde) olarak kaydedilmiştir. Tulecke ve McGranahan (1985), cevizde (*Juglans regia* L.) tam çiçeklenmeden 7-11 hafta sonra alınan olgunlaşmamış kotiledonlardan %10-33'ünün embriyonik olduğunu belirlemişlerdir. Neuman vd (1993) cevizde (*Juglans nigra* L.) olgunlaşmamış kotiledonlardan hazırlanan 1 cm² büyüklüğündeki eksplantlardan tam çiçeklenmeden 8-12 hafta sonra %62-80 oranında somatik embriyo elde etmişlerdir.

Çalışmamızda somatik embriyo oluşumu sadece limonda kaydedilmiştir. Kaba limonda kültürlerin 12. haftasından (3. aydan) itibaren ovaryum ve stillerden 5 mg/l BA içeren ortamlarda embriyolar oluşmaya başlamıştır (çizelge 4.10, şekil 4.24, 4.25 ve 4.26). Carimi vd (1994) de çalışmalarında limonda (*Citrus limon* (L.) Burm.) stilden BA içeren ortamlarda elde edilen *in vitro* kalluslardan 2. ve 3. aylarda 680 adet, kontrole ait kalluslardan 481 adet embriyo oluştuğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız, araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda limonda ovaryumların %21'i ve stillerin %23.5'i somatik embriyo oluşturmuştur (çizelge 4.10). Carimi vd (1999) limonda ince hücre tabakalarından oluşturulan kültürlerden (TCL) stigma kültürlerinde, somatik embriyo oluşum oranlarını ve miktarını MS ortamında %12.6 ve 11.7 adet, 500 mg/l malt ekstraktı içeren MS (MS I) ortamında %17.2 ve 11.1 adet ve 500 mg/l malt ekstraktı ve 3 mg/l BA içeren MS (MS II) ortamında %42.4 ve 31.3 adet; stil TCL kültürlerinde MS ortamında %3.8 ve 12.5 adet, MS I ortamında %3.0 ve 15.0 adet ve MS II ortamında %5.2 ve 14.0 adet olarak kaydetmişlerdir. Bu çalışmada limonda tam stigmadan MS, MS I ve MS II ortamlarında sırasıyla %26.7, 33.3 ve 73.3, tam stilden %13.3, 16.7 ve 23.3 oranlarında embriyo oluşumu sağlanmıştır. Fiore vd (2002) de limonda (*C. limon* (L.) Burm. cv "Ferminello") stigma ve stil TCL kültürlerinde 3-5 ay sonra kallus dokusundan somatik embriyoların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Stil TCL kültürlerinde embriyo oluşumu %0 (2,4-D içeren ortamlarda) ile %16 (4-CPPU içeren ortamlarda) arasında değişmiştir. En iyi sonuçlar stigma TCL kültürlerinde ve

özellikle 1 mg/l 4-CPPU ilave edilen ortamlarda %24.8 ile elde edilmiştir. Çalışmamızda limonda stigmadan somatik embriyo elde edilememiştir. Carimi vd (1994) de stigmadan embriyo oluşumunu rapor etmemiştir. Oysa Carimi vd (1999) stigma TCL kültürlerinde %11.1-42.4; tam stigmada %26.7-73.3, Fiore vd (2002) ise stigma TCL kültürlerinde %24.8 oranında somatik embriyo elde etmişlerdir. Stile ait %23.5 oranındaki bulgumuz Carimi vd (1999)'nin limonda tam stilden elde ettikleri %13.3-23.3'lük oranlarla uyum göstermektedir. Bu doku ile ilgili olarak Fiore vd (2002)'nin bulguları (%0-16) bu sonuçların altındadır. Çalışmamızda limonda ovaryumdan %21 oranında somatik embriyo oluşturulmuştur. Oysa Carimi vd (1999) limonda bu dokudan somatik embriyo oluşmadığını bildirmiştir.

Çalışmamızda Stanley erik çeşidi dışındaki tür ve çeşitlerde farklı tiplerde kallus gelişimi gözlenmiştir. Armut, ayva ve elmada ovaryum + çiçek tablası; kayısı, kiraz, vişne ve cevizde ovaryum; fındıkta etrafındaki yaprak taslakları ile birlikte birkaç bir arada kültüre alman dişi çiçek eksplantlarında ve limonda stigma, stil ve ovaryumdan kallus oluşumu sağlamıştır. En yüksek kallus oranları, ceviz ve limon dışındaki türlerde 2,4-D uygulamalarında kaydedilmiştir. Limonda stigmada ve cevizde BA, limonda ovaryum ve stilde BA ve 2,4-D uygulamalarında kallus oluşumu daha yüksek oranlarda meydana gelmiştir. Çalışmada Ankara armudunda %82.5-100, Ekmek ayvasında %22.5-74.5, Gloster elmasında %54-68.7, Şekerpare kayısısında %47.4-51, Dalbastı kirazında %40.6-44, Kütahya vişnesinde %28-50, Kaman cevizinde %51-56.5, fındıkta %22.6-35.8, limonda %46-100 oranlarında kallus oluşumu saptanmıştır. Bu kalluslar Ankara armudunda BA uygulamalarında saydam ve sulu (şekil 4.2 ve 4.4), 2,4-D uygulamalarında beyaz ve pamuğa benzer yapıda (şekil 4.3), Ekmek ayvasında yeşilimsi beyaz ve kısmen sert yapıda (şekil 4.5), Gloster elma çeşidinde beyaz-yeşil renkte ve sulu yapıda, Şekerpare kayısısında beyaz-kahverengimsi ve yumuşak yapıda, Dalbastı kirazında beyaz renkte, yumuşak ve sulu, Kaman cevizinde ve fındıkta kahverengi yumuşak yapıda, Kara limonda 2,4-D uygulamalarında beyaz-yeşilimsi renkte, sert ve camsı yapıda, BA uygulamalarında ise krem-kahve rengine, yumuşak ve sulu yapıda oldukları gözlenmiştir (şekil 4.20). Literatürde bu türlerde dişi organ dokularından gelişen kallusların yapı ve oranları konusunda sadece limonlarda bulguya rastlanmıştır. Carimi vd (1994), limonda (*Citrus limon* (L.) Burm.) stilden kontrol, 2,4-

D ve BA uygulamalarından %33.6-84.03 ve Carimi vd (1999) BA bulunan ve bulunmayan ortamlarda stil TCL kültürlerinde %70.5-88 oranlarında kallus oluşumu elde etmişlerdir. Çalışmamızda stilden kontrol, 2,4-D ve BA uygulamalarında %40-100 oranında kallus elde edilmiştir. Bu bulgular araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Carimi vd (1999) BA bulunan ve bulunmayan ortamlarda stigma ve ovaryum ince hücre tabaka (TCL) kültürlerinde sırasıyla %83.3-96.6 ve %80.6-98.5 oranlarında kallus oluşumu sağlamışlardır. Çalışmamızda bu dokulardan elde edilen değerler sırasıyla %11-46 ve %54-100 arasında bulunmuştur. Bu değerlerden stigma için olanlar Carimi vd (1999)'nin bulgularından daha düşüktür.

Somatik embriyo oluşumu açısından eksplantlardan elde edilen kallusların embriyonik karakterde olması gerekmektedir. Çalışmamızda sadece limon türünde direkt ya da indirekt yolla 5 mg/l BA uygulamasından somatik embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Dolayısıyla bulgularımız yüksek dozda uygulanan BA'nın embriyonik kallus oluşturduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Carimi vd (1997) de keçi boynuzunda (*Ceratonia siliqua* L.) 20-25 mm uzunluğundaki küçük baklalardan ayrılan döllenmiş ovullardan, 3 mg/l BA içeren MS ortamında embriyonik kallus elde edildiğini bildirmiştir. Aynı şekilde Carimi vd (1994), limonda (*Citrus limon* (L.) Burm.) stilden somatik embriyo oluşumu konusunda yaptıkları çalışmada BA içeren ortamlardan elde edilen *in vitro* kalluslardan ikinci ve üçüncü aylarda 680 adet, kontrole ait kalluslardan 481 adet embriyo oluştuğunu, ancak 2,4-D uygulamasından elde edilen kallus dokularından embriyo oluşumunun gerçekleşmediğini belirtmiştir. Carimi vd (1995) de *C. sinensis* (L.) Osb. cv Sanguinello çeşidinde en yüksek somatik embriyo oluşumunun (128.1 adet) BA içeren ortamlardan elde edilen kallustan meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Carimi vd (1999) farklı *Citrus* türlerinde stigma, stil ve ovaryumun ince hücre tabakalarından en fazla somatik embriyo oluşumunu *C. tardiva* dışında BA uygulanan kültürlerden sağlamışlardır. Fiore vd (2002) ise *Citrus* türlerinde stigma ve stil dokularının ince tabakalar halinde kesildiği kültürlerde somatik embriyo oluşumu üzerine 2,4-D ve 4-CPPU (N-2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea'nun etkilerini araştırmışlardır. Kültürlerde 3-5 ay sonra kallus dokusundan somatik embriyoların meydana geldiği görülmüştür. *C. limon*'da stil TCL kültürlerinde embriyo oluşumu %0 (2,4-D içeren ortamlarda) ile %16 (4-CPPU içeren ortamlarda) arasında değişmiştir.

Somatik embriyo oluşturma potansiyeli daha yüksek bulunan limonda en iyi sonuçlar stigma TCL kültürlerinde ve özellikle 1 mg/l 4-CPPU ilave edilen ortamlarda %24.8 ile elde edilmiştir. Genellikle *Citrus* türlerinde özellikle BA uygulamalarının embriyonik kallus oluşumunda etkili olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, farklı meyve türlerinin dişi organ dokularından somatik embriyo oluşturma potansiyellerinin incelendiği bu çalışmada sadece limon türünde başarı elde edilmiştir. Bununla birlikte erik dışındaki tüm türlerde kallus oluşumu sağlanmıştır. İleriki aşamada bu kallusların embriyonik özellikte olup olmadığı yntyle ayrıntılı çalışmaların yapılması somatik embriyo eldesi güç olan bu türler açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Akhtar, N. and Jain, S. M. 2000. Application of somatic embriyogenesis for the improvement of tropical fruit trees. In: Jain, M.S., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (Eds). Somatik Embriyogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, pp 215-244, The Netherlands.
- Aygün, A. ve Dumanoglu, H. 1999. Ayvada (*Cydonia vulgaris* Pers.) olgunlaşmamış çenek yapraklardan somatik embriyo oluşumu. Tarım Bilimleri Dergisi, 5 (2); 50-57.
- Bhansali, R. R. and Singh, M. 2000. Somatik embriyogenesis in fruit and forest trees of arid zone. In: Jain, M.S., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (Eds). Somatik Embriyogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, pp 141-167, Netherlands.
- Carimi, F., De Pasquale, F. and Crescimanno, F.G. 1994. Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). Plan Cell Tissue Organ Culture, 37; 209-211.
- Carimi, F., De Pasquale, F. and Crescimanno, F. G. 1995. Somatik embriyogenesis in *Citrus* from styles culture. Plant Science, 105; 81-86.
- Carimi, F., Lorenzo, R.D. and Crescimanno, F.G. 1997. Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia simiqua* L.) from ovule culture. Scientia Horticulturae, 70; 73-79.
- Carimi, F., Tortorici, M.C., De Pasquale, F. and Giulio, F. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explant of orange navel group. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54; 183-189.
- Carimi, F., De Pasquale, F. and Crescimanno, F.G. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell Reports, 18; 935-940.
- Centeno, M.L., Rodriguez, R., Berros, B. and Rodriguez, A. 1997. Endogenous hormonal content and somatic embriyogenic capacity of *Corylus avellana* L, cotyledons. Plant Cell Reports, 17 ; 139-144.

- Chaudhry, Z., Rashid, H. and Quraishi, A. 1993. Analysis of protein and peroxidase from embryogenic and non-embryogenic cultures of *Citrus reticulata* L. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 36 (1); 20-22.
- Daigny, G., Paul, H., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv 'Gloster 69'). Plant Cell Reports, 16; 153-157.
- De March, G., Grenier, E., Miannay, N., Sulmont, G., David, H. and David, A. 1993. Potential of Somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34; 209-215.
- Dodds, J.H. and Roberts L.W. 1993. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, pp 1-121, New York.
- D'Onghia, A.M., De Pasquale, F., Carimi, F., Savino, V. and Crescimanno, F.G. 1997. Somatic embryogenesis from style culture as a possible means for virus elimination in *Citrus*. J. Phytopathology, 145; 77-79.
- D'onofrio, C. and Morini, S. 2002. Increasing NaCl and CaCl₂ concentration in the growth medium of quince leaves. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 28 (4); 366-372.
- Fiore, S., De Pasquale, F., Carimi, F. and Sajeva, M. 2002. Effect of 2,4-D and 1-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68; 57-63.
- Gill, M.I.S., Dhillon, B.S., Singh, Z. and Gosal, S.S. 1991. Induction of frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in mandarin. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 12; 231-235.
- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. and Gosal, S.S. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on vallusis derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenora). Journal of Horticultural Science, 69 (2), 231-236.
- Gutierrez-Pesce, P., Taylor, K., Muleo, R. and Rugini, E. 1998. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1885 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, 17; 574-580.

- Hansen, G. and Wright, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4 (6); 226-231.
- Karp, A. 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity. *Acta Hort.*, 530; 17-29.
- Litz, R.E. and Gray, D.J. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E. (Eds). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. pp 3-34, Cambridge.
- Mandegaran, Z., Roberts, A.V. and Hammat, N. 1999. The ability of *Prunus avium* x *P. pseudocerasus* 'Colt' to form somatic embryos *in vitro* contrasts with the recalcitrant of *P. avium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59; 57-63.
- Michalcuk, L. and Druart, P. 1999. Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil® cherry rootstock (*Prunus incisa* x *serrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, nonembryogenic calli of *Prunus insicia* x *serula* and *Prunus domestica*. *Physiologia Plantarum*, 107; 426-432.
- Neuman, M.C., Preece, J.W., Sambeek, V. and Gaffney, G.R. 1993. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon of Eastern black Walnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32; 9-18.
- Onay, A., Jeffre, C.E. and Yeoman, M.M. 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L. *Plant Cell Reports*, 15; 192-195.
- Özcan, S., Babaoglu, M. ve Sancar, C. 2001. Somatic embryogenesis. In: Babaoglu, M., Gürel, E. and Özcan S. (Eds). *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü Teknikleri ve Uygulamaları*, pp 71-88, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Parrot, W.A., Merkle, S.A. and Williams, E.G. 1993. Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray, D.R. (Eds). *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*. pp 159-189. University of Georgia, Athens.
- Paul, H., Bellaiz, M. and Sangwan-Norel, B.S. 1994. Somatic embryogenesis in apple. *Journal of Plant Physiology*, 143; 78-86.
- Rahman, H., James, D.J., Calagariy, P.D.S., Wetten, A., Davey, M.R., Alderson, P.G., Lowe, K.C. and Power, J.B. 1998. Factors effecting the induction of somatic embryogenesis apomictic apple embryos. *Tree Biotechnology*, (towards the millenium); 101-113.

- Singh, A.K., Nito, N., Iwamasa, M. and Subhadrabandhu, S. 1992. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of *Citrus* callus. *Acta Horticulture*, 321; 606-609.
- Tang, H., Ren, Z. and Krczal, G. 2000. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 83; 109-126.
- Tulecke, W. and McGranahan, G. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Science*, 40; 57-63.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya’da 1977 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Malatya’da tamamladı. 1996 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nden 2000 yılında Ziraat mühendisi ünvanıyla mezun oldu. Eylül 2000-Ağustos 2003 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.

2001 Ağustos ayında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Meyve Yetiştirme ve Islahı Bilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen aynı göreve devam etmektedir.

