

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BADEMİN (*Amygdalus communis* L.cv. NONPAREİL)
BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE *İN VİTRO* KOŞULLARDA
MİKROPROPAGASYON YOLLARININ ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem İŞİKALAN

**DOKTORA TEZİ
(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)**

DİYARBAKIR - 2003

T.C.

7.2010

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı – Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Davut BAŞARAN.....

Üye: Doç.Dr. Hasan Çetin ÖZEN.....

Üye: Doç.Dr. Ahmet ONAY.....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ.....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hatice BUDAK.....

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

16/04/2003

[Handwritten Signature]
İmza
Prof. Dr. Çetin AYTEKİN
Ünvanı, Adı-Soyadı

Enstitü Müdürü

(Mühür)



TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı planlayan ve yön veren, çalışmalarım süresince yapıcı eleştirileri ile araştırmaların yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneylerin planlanmasından, sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesine kadar büyük ilgi ve yardımlarını gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Ahmet ONAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresi boyunca her an yanımda olan, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında yardımcı olan sevgili arkadaşım Araş. Gör. Filiz ADIYAMAN'a, ayrıca büyük manevi desteklerini gördüğüm arkadaşlarım sayın Yrd. Dr. Süreyya NAMLI ve Yrd. Dr. Aysel BEKLEYEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Materyalin temini için yaptığım yolculuklarda bana arkadaşlık eden biricik kardeşlerim Ali İsmet ve Hüseyin IŞIKALAN'a, doktora sırasında kaybettiğim ve her an yanımda hissettiğim biricik ANNE ve BABAM'ın acısını birlikte paylaştığım ve yaşadığım bu büyük acıya rağmen doktora çalışmalarımın tekrar devam etmemde manevi destek veren bütün kardeşlerime ayrı ayrı sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, D.Ü. Araştırma Fonu tarafından DÜAP-2001-FF-427 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
1.1. Badem Hakkında Genel Bilgiler.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Bitki Biyoteknolojisinin Tarihsel Gelişimi.....	5
2.2. Bitki Biyoteknolojisinde Kullanılan Yöntemler.....	6
2.2.1. Mikroçoğaltma.....	6
2.2.2. Virüsten Arındırma.....	12
2.2.3. Sentetik Tohumlardan Bitki Üretimi.....	13
2.2.4. Protoplast Füzyonu.....	14
2.2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	15
2.2.6. Somaklonal Varyasyonlar.....	15
2.2.7. Bitki Hücre Kültürleriyle Sekonder Bileşiklerin Üretimi.....	16
2.3. Badem İle İlgili Bazı Çalışmalar.....	17
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Eksplant Şekilleri.....	30
3.2. Metod.....	32
3.2.1. Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	32
3.2.2. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu.....	32
3.2.3. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	32
3.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	33
3.2.5. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	35
3.2.6. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu.....	36
3.2.6.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Olgun Tohumlarının Çimlenmesi ve Dekontaminasyonu Üzerine NaOCI'in Etkisi.....	36
3.2.6.2. Bademin Ürün Veren Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Yüzey Sterilizasyonuna NaOCI'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	37
3.2.6.3. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCI içinde Optimum Bekletilme Süresinin Araştırılması.....	38

3.2.6.4. Bademin Ürün Veren Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna NaOCI'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	39
3.2.6.5. Nonpareil Badem Çeşidinde Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu.....	40
3.2.7. Ekim İşlemleri.....	40
3.2.7.1. Bademin (<i>Amygdalus communis</i> L.cv. Nonpareil) Olgun Tohumlarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	40
3.2.7.1.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Zigotik Embriyolarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmalarında Sitokininlerin Etkisi.....	40
3.2.7.1.2. <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna BAP Konsantrasyonlarının Etkisi.....	41
3.2.7.1.3. <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Oksin Çeşidi ve Oksin Oranlarının Etkisi.....	42
3.2.7.1.4. <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna MS Miktarlarının Etkisi.....	42
3.2.7.1.5. <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Şeker Çeşidinin Etkisi.....	43
3.2.7.1.6. <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Materyal Şeklinin Etkisi.....	43
3.2.7.1.7. Zigotik Embriyolardan <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Mikroçoğaltılması.....	43
3.2.7.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından İtibaren Organogenesis Çalışmaları.....	44
3.2.7.2.1. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının <i>In Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltılması.....	44
3.2.7.2.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların <i>In Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltılması.....	44
3.2.7.3. Nonpareil Çiçek Tomurcuklarından Kallus Oluşturma Çalışmaları.....	46
3.2.7.4. Köklendirme Çalışmaları.....	46
3.2.7.4.1. Badem Sürgünlerinin <i>In Vitro</i> Şartlarda Köklendirilmesine IAA ve NAA'in Etkisi.....	46
3.2.7.4.2. Sürgünlerin <i>In Vitro</i> Şartlarda Köklendirilmesinde Işığın Etkisi.....	47
3.2.7.4.3. Sürgünlerin <i>In Vitro</i> Köklendirilmesinde WPM'un Etkisi.....	47
3.2.7.4.4. Sürgünlerin <i>In Vitro</i> Köklendirilmesinde IAA'in Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi.....	48

4. BULGULAR.....	49
4.1. Bademin (<i>Amygdalus communis</i> L.cv Nonpareil) Olgun Tohumlarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	49
4.1.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Zigotik Embriolarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmalarında Sitokininlerin Etkisi.....	49
4.1.2. <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna BAP Konsantrasyonlarının Etkisi.....	55
4.1.3. <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Oksin Çeşidi ve Oksin Oranlarının Etkisi.....	58
4.1.4. <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna MS Miktarlarının Etkisi.....	59
4.1.5. <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Şeker Çeşidinin Etkisi.....	63
4.1.6. <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Materyal Şeklinin Etkisi.....	63
4.1.7. Zigotik Embriyolardan <i>İn Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Mikroçoğaltılması.....	64
4.2. Ürün Veren Nonpareil Badem Ağaçlarından İtibaren Organogenesis Çalışmaları.....	67
4.2.1. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının <i>İn Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltılması.....	67
4.2.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların <i>İn Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltılması.....	70
4.3. Nonpareil Çiçek Tomurcuklarından Kallus Oluşturma Çalışmaları.....	74
4.4. Köklendirme Çalışmaları.....	76
4.4.1. Badem Sürgünlerinin <i>İn Vitro</i> Şartlarda Köklendirilmesine IAA ve NAA'ın Etkisi.....	76
4.4.2. Sürgünlerin <i>İn Vitro</i> Şartlarda Köklendirilmesinde Işığın Etkisi.....	76
4.4.3. Sürgünlerin <i>İn Vitro</i> Köklendirilmesinde WPM'un Etkisi.....	77
4.4.4. Sürgünlerin <i>İn Vitro</i> Köklendirilmesinde IAA'ın Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi.....	77
4.5. <i>İn Vitro</i> Koşullarda Elde Edilen Badem (<i>Amygdalus communis</i> L.cv Nonpareil) Fidelerinin Toprağa Adaptasyonu.....	80

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	82
6. KAYNAKLAR.....	86
7. TABLOLARIN LİSTESİ.....	95
8. RESİMLERİN LİSTESİ.....	96
9. ÖZGEÇMİŞ.	98

AMAÇ

Bademin anavatanı Anadolu olmasına rağmen, ülkemiz bu meyve türünün dış satımında önemli bir yere sahip olmamıştır. Günümüze kadar bademin tohumla generatif üretiminden, standart ürün almak mümkün olmamıştır. Son yıllarda yurt dışından getirilen Texas, Drake ve Nonpareil gibi standart çeşitlerle kurulan bahçeler sınırlı kalmış ve aynı bahçelerden alınan badem çeşitlerinden dahi, bir örnek meyve elde edilememiştir.

Çalışmada, bölgemizde yetiştiriciliğinin yapılması uygun olan Nonpareil badem çeşidinin olgun tohum ve yaşlı dokularını kullanarak mikroçoğaltma tekniklerini araştırdık. Günümüzde kullanılan geleneksel çoğaltma yöntemlerinin aksine, kısa süre içinde çok sayıda, standart çeşitlerin seri bir şekilde üretilmesini amaçladık.

Bu çalışmadaki amacımız, yurdumuzun ekonomisine yüksek katkı sağlayacak olan Nonpareil badem çeşidinin, mevsime bağlı kalmaksızın biyoteknolojik yöntemler ile, bölgemizin iklim şartlarına adaptasyonunu temin etmek ve hızlı fidan üretimini mümkün kılmaktır.

ÖZET

Çalışmada, olgun tohumlardan izole edilen zigotik embriyolar ve ürün veren ağaçlardan alınan farklı dokular kullanılarak, *Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil badem çeşidinin, organogenesis ile çoğaltılması metodları geliştirildi. Bunun için, zigotik embriyo ve meyve veren ağaçlardan alınan lateral, apikal ve çiçek tomurcuklarından itibaren, steril eksplantların üretimi için, yüzey sterilizasyon metodları ortaya kondu.

Böylece, *in vitro* hızlı fide-fidan üretimini kontrol eden faktörlerden kültür başlangıcı, sürgün proliferasyonu, rizojenез, köklü fidelerin toprağa adaptasyonu işlemleri araştırıldı.

Farklı sitokin (BAP-kinetin) konsantrasyonlarında kültüre alınan zigotik embriyoların aksenik çimlenmesinin, BAP'ın düşük konsantrasyonlarında (0.5 - 1.0 mg l⁻¹) maksimum randıman verdiği tespit edildi.

Hormon içermeyen besi ortamında çimlendirilen zigotik embriyolar, BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.1–0.5– 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹) kültüre alınarak, sürgün proliferasyonuna etkisi araştırıldı ve 1.0–2.0 mg l⁻¹ BAP konsantrasyonlarında en iyi sonucu verdiği saptandı.

Sürgün proliferasyonu için BAP'ın yanında oksin (IAA, NAA) ilavesinin etkisi araştırıldı ve BAP'ın etkisinin değişmediği, hatta oksin ilave edildiğinde yeni sürgün oluşumunda azalma olduğu gözlemlendi.

Sürgün proliferasyonuna, MS yoğunluğunun etkisi araştırıldı. 1/1 MS ortamının test edilen diğer MS (1/2 - 1/4 ve 2/1) kuvvetlerinden daha iyi sonuç verdiği görüldü.

Başlangıç materyali olarak kullanılan eksplant şeklinin sürgün çoğaltılmasına etkisi araştırıldı ve bir nod bulunan eksplantların test edilen diğer eksplant tiplerinden daha iyi olduğu gözlemlendi.

Ürün veren badem ağaçlarından alınan apikal ve lateral tomurcuklar, 0.5 -1.0 mg l⁻¹ BAP ile desteklenen 1/1 MS besi ortamında kültüre alındı. 1 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcuklardan 4 alt kültür sonucunda, başlangıç materyal sayısının 2-2.5 katı oranında sürgün elde edildi.

8 mg l⁻¹ IAA ve 1/2 MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların %50'sinin köklendiği tespit edildi. Köklenen fidelerin *in vivo* şartlara adaptasyonu sağlandı.

Çiçek tomurcukları farklı oksin konsantrasyonlarının bulunduğu MS besi ortamlarında kültüre alınarak yoğun kallusun 2.0 mg l⁻¹ 2-4 D içeren besi ortamında geliştiği tespit edildi.

SUMMARY

In this study, methods were developed for organogenesis of almond, “*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil” using tissues of zygotic embryos isolated from mature seeds and lateral, apical buds of mature trees.

Effective surface sterilization methods were achieved for the production of sterile explants from zygotic embryo and mature lateral, apical and flowers buds of *Amygdalus communis* Lcv. Nonpareil.

The factors for controlling rapid production of plantlets, the culture initiation, proliferation, rooting and acclimatisation of plantlets derived from seedlings and mature trees were investigated. The results obtained are described below.

Zygotic embryos were cultured in MS medium containing different concentrations of cytokinin (BAP, and kinetin). Best results for axenic germination was obtained with low BAP concentrations (0.5-1.0 mg l⁻¹).

The zygotic embryos germinated on the MS medium without PGR (Plant Growth Regulator) were cultured in different BAP concentrations (0.1-0.5-1.0-2.0 mg l⁻¹). The effect of BAP at different concentration on shoot proliferation was investigated and the concentrations of 1.0 – 2.0 mg l⁻¹ BAP were found to be the most effective.

Effects of the strength of MS medium on shoot proliferation were examined. The highest number of proliferated shoots was obtained on the full strength MS medium (1/1) compared to the others (1/2 – 1/4-2/1).

The effect of explant source used for multiplication was also investigated. Explants with nod and an leaf gave better proliferation then the other explant types tested.

Apical and lateral buds from mature trees were cultured on MS medium containing 0.5–1.0 mg l⁻¹ BAP, 40 g/l sucrose and 0.7 % agar. A maximum of 2-2.5 fold shoots was obtained on MS medium with 1 mg l⁻¹ BAP from lateral buds after 4 subculture.

50 % of explants cultured on 1/2 MS medium with 8 mg l⁻¹ IAA was rooted. In all the *in vitro* rooted shoots were successfully adapted at *in vivo* condition.

Flower buds were cultured in MS medium containing different auxin concentrations and the dense callus formation was observed at 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D.

1. GİRİŞ

1.1. Badem Hakkında Genel Bilgiler

Tabiat, insanoğluna gereksinimlerini karşılamak üzere çeşitli bitkiler sunmuştur. İnsanoğlu zamanla doğanın sunduğu bu bitkilerden maksimum düzeyde yararlanmanın yollarını aramış ve başarılı olmuştur. Günümüzde, teknolojinin ilerlemesiyle bitkiler sadece temel besin kaynağı olarak değil, aynı zamanda eczacılık, kozmetik, giyim ve kağıt üretimi gibi sanayi alanlarında da kullanılmakta ve gittikçe ön plana çıkmaktadır.

Dünyada canlı sayısındaki artış, beraberinde gereksinimlerin çeşitlenmesine ve artışına neden olmuştur. Bu nedenle insanoğlu, teknolojiden faydalanarak birim alandan daha fazla ürün almanın yollarını aramaya başlamıştır. Aynı zamanda, tüketilen temel besinin yanı sıra karbonhidrat, vitamin ve minerallerce zengin olan meyve yeme alışkanlığını kazanılmıştır. Ayrıca meyve tüketiminin dengeli beslenmedeki öneminden dolayı, çeşitçe zengin ve daha kaliteli meyveler üretebilme çabası içerisinde meyve bahçeleri kurmak amacıyla, yeni yöntemlere başvurulmuştur.

Ülkemiz, dört mevsimin yaşandığı her türlü meyve ve sebze yetiştirmeye uygun topraklara sahip olması açısından şanslıdır. Modern teknolojiyi yaşadığımız bu dönemde, standart, kaliteli, verimli meyve üretebilmek ve üretilen ürün ile hem kendi talebimizi karşılamak, hem de dış piyasaya arz edebilmek, ülke ekonomisine büyük katkı sağlayacağı gibi, yetiştiricinin de refaha çıkmasını mümkün kılacaktır. Bölgemizin iklim ve toprak özelliği badem yetiştiriciliğine çok uygundur. Yerli çeşitlerin yanı sıra dışarıdan getirilen kültür çeşitleri de kolayca adapte olmuşlardır. Geçici ve verim kalitesi yüksek olan badem ağaçları ile kurulacak bahçeler bölge halkına gelir kaynağı olabileceği gibi, dünya badem yetiştiriciliğinde bulunmamız gereken yerlerde olmamızı sağlayacaktır.

Memleketimizde badem yetiştiriciliği bugün bile büyük ölçüde çekirdekle yetiştirmeye dayanmaktadır. Bu nedenle piyasaya arz edilen çeşitler büyük bir zenginlik ve karışıklık içindedir. Türkiye, Avrupa Ekonomik Komisyonunun bir üyesi olarak, badem standartlarını uygulamayı kabul etmiştir. Türkiye’de badem yetiştiriciliğine elverişli bir çok alan vardır. Bu durumda yapılacak iş, bir yandan yerli çeşitler içerisinde yetiştiricilik ve piyasa yönünden en uygun olanları seçip bunları aşı ile üretmek suretiyle kaliteli çeşitleri tespit etmek, diğer yandan da dünya üzerinde başlıca üretim bölgelerindeki çeşitleri getirerek, bunların değişik bölge şartlarına uyma durumlarını denedikten sonra, uygun görülenlerinin aşı ile üretilip yayılmalarını sağlamaktır (**Özbek, 1978**).

Genel olarak meyve ağaçlarının çoğaltılmasında; tohum, çelik, aşılama, daldırma ve mikroçoğaltma gibi değişik yöntem ve yollar kullanılmaktadır. Uygulanan bu yöntemlerin birinin diğerlerine göre avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Meyve ağaçlarını çoğaltmada kullanılan yöntemler aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

Tohum ile çoğaltma: Doğal bir yöntemdir ve doğada kendiliğinden oluşur. Kolay, çabuk ve çok sayıda bitkiyi bu yöntemle elde etmek mümkündür. Ancak, tohumla yapılacak çoğaltmada, tohumların kalıtsal yapıları birçok sorunları beraberinde getirmektedir. Tohumun yapısı heterozigot olduğu için bundan oluşacak yeni bireyler ana ve babaya benzemezler. Bu nedenle meyve yetiştirme tekniğinde, tohumla çoğaltma yalnız anaç elde etmeye yönelik bir işlemdir.

Çelik ile çoğaltma: Çok eski yıllardan beri bilinen ve uygulanan kolay bir yöntemdir. Çelik, herhangi bir bitkiden kesilen köksüz dal, yaprak, göz, gövde ve kök parçalarına denir. Bunların uygun çevre koşullarında köklendirilerek, yeni bitkilerin elde edilmesi işlemine de çelikle çoğaltma adı verilir. Bu yöntemle oluşacak yeni bireyler, ana bitkinin benzerini oluşturacağı için üzerinde önemle durulması ve dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu çoğaltma şekli ile, başlangıçta yapılacak hataları gidermek güç olabileceği gibi ekonomik kayıplara da neden olabilir.

Aşı ile çoğaltma: Bir meyvenin tür veya çeşidinden alınan bir göz ya da kalemin anaç üzerine yerleştirilmesine aşı, yapılan bu işleme de aşılama denir. Aşı, ancak iletim dokusu oluşturan ksilem ve floem dokuları arasında meristematik özellikte ve sürekli doku halindeki kambiyumu içeren bitkiler arasında yapılabilmektedir. Aşılama sonucu oluşacak yeni bitkide, göz yada kalem, ağacın taç kısmını anaç ise kök tarafını oluşturur. Bunun sonucu iki sistem arasında ortak fakat biri birine bağımlı ve zorunlu bir yaşam başlamış olur. Aşılama, anaç ve aşı kaleminin uyuşması ve aşılama zamanı çok önemlidir.

Daldırma ile çoğaltma: Oldukça kolay fakat meyve yetiştiriciliğinde sınırlı olarak kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz, 1992).

Mikroçoğaltma: Mikroçoğaltmadaki amaç; kısa sürede ana bitkiye benzeyen çok sayıda sağlıklı yeni bitkiler elde etmektir.

Bademin ilkbahar geç donlarından zarar görmesi yalnız yurdumuzda değil diğer badem üreticisi ülkelerde de büyük bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle Amerika, Rusya, Yugoslavya, Bulgaristan, Yunanistan, İtalya, İspanya, Fransa ve Portekiz gibi

dünya badem yetiştiriciliği ve dış satımında önemli yeri olan ülkelerde ilkbahar geç donlarından zarar görmeyecek, geç çiçek açan çeşitlerin üzerinde çalışılmaktadır (**Küden ve Ark., 1997**).

İç badem üretim miktarı bakımından 416.670 ton/yıl ile ABD. başta gelmekte, bunu 221.000 ton/yıl ile İspanya, 95.000 ton/yıl ile İtalya, 28.000 ton/yıl ile Türkiye ve diğerleri izlemektedir (**Anonymous, 1984**).

Amerika Birleşik Devletlerinde, badem üretimi tamamen belirli standart çeşitlerle yapılmaktadır. Amerika'da ilk yıllarda İspanya, İtalya ve Portekiz'den getirtilen badem çeşitleri yetiştirilmiştir. Daha sonra bu çeşitlerin tohumlarından yetiştirilen bireyler içinde yapılan seleksiyonla bazı değerli çeşitler elde edilmiştir. İspanya ve İtalya'da da badem yetiştiriciliği, tohumla üretim yanında seçilmiş tipler ve melezleme sonucu elde edilen aşılı fidanlar ile yapılmaktadır. Böylece kısmi bir standardizasyon sağlanmıştır. Diğer Akdeniz ülkeleri de standart çeşitler üzerinde çalışmaktadır (**Özbek, 1978; Dokuzoğuz, Gülcan, 1979**).

Bodur acı bademin (*Amygdalus nana* L.) Anadolu'da zengin varyasyonlar göstererek yayılmış olması, ülkemizin, bademin gen merkezlerinden biri olduğunu kanıtlamaktadır. Bilindiği gibi badem, soğuklama gereksinimi düşük olan bir meyve türüdür. Bu bakımdan ülkemiz, bademin gen merkezlerinden biri olmasına rağmen, ilkbahar geç donlarının hüküm sürdüğü yerlerde badem ağaçlarından verim alınamamaktadır (**Özbek, 1978; Dokuzoğuz, Gülcan, 1979**).

Ülkemizde badem yetiştiriciliği, özellikle Güney-Batı Ege kıyılarında yoğunlaşmıştır. Bu bölgede yetiştirilen çeşitler yerli çeşitler olup, bazı ekstrem yıllarda, ilkbahar donlarından zarar görmektedir. Bunlar üzerinde yapılan seleksiyon çalışmalarında, bazı geç çiçeklenen çeşitler bulunmuştur (**Dokuzoğuz ve Gülcan, 1979**). Örneğin, geç çiçeklenen bir badem çeşidi olan Texas çeşidinden 1-2 gün kadar geç çiçeklenen 101-9, 101-13 ve 101-23 (Gülcan-1) gibi tipler saptanmıştır (**Kaşka ve ark., 1992**). Ancak İspanya, İtalya, Fransa ve ABD'de yapılan ıslah araştırmaları, hem çok geç çiçeklenen hem de yüksek kaliteli ve verimli olan aynı zamanda aşırı soğuklardan zarar görmeyen çeşitlerin elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca elde edilen çeşitlerin bazılarında yetiştiricilik için çok önemli bir özellik olan, kendine verimlilik sağlanmıştır. O halde bu çeşitlerin kendi çeşitlerimizle karşılaştırmalı olarak GAP bölgesinde denenmesinde, ülkemizin tarım ekonomisine katkısı açısından büyük yararı vardır. Öte yandan, sulanabilir alanlarda

kurulacak modern badem bahçeleri, kısa zamanda yetiştiricilere yüksek gelir sağlayabilecektir (**Küden ve Ark., 1997**).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bitki doku kültürü tekniğinin gelişmesi ile, günümüzde hastalıklardan arındırılmış ve standart hızlı fide-fidan üretimi, yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Geleneksel metotlarla çimlenmesi ve yetiştirilmesi güç olan meyve ağaçlarını, bitki doku kültürü tekniği ile kısa sürede ve kolay bir şekilde yetiştirmek mümkün olmuştur.

Son 10-15 yıl içerisinde hızla gelişen ve çok fazla yararlar sağlayan “Biyoteknoloji” kısaca, biyolojik teknoloji veya teknolojinin biyolojiye uygulanması olarak tanımlanabilir.

Bitkilerdeki ilk biyoteknolojik uygulamalar, bitki hücrelerinin *in vitro* üretilmesi ‘bitki doku veya hücre kültürleri’ ile başlamıştır. Hayvan hücrelerinden çok ayrı ve aynı zamanda çok önemli olan nokta, *in vitro* koşullarda tam bir bitkiyi, o bitkiye ait tek bir hücreden üretmenin mümkün olabilmesidir. Bitkilerdeki bu özellik, organ, doku ve bir hücrenin tam bir bitkiyi oluşturabilecek yetenek ve genetik bilgilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (**Arda, 1995**).

Bitki biyoteknolojisi; bitki organ, doku ve hücrelerinin steril suni besi ortamlarında kültürü, çoğaltılması ve bunların genetik olarak değiştirilmesini kapsar. Bu tekniklerin bitkilere uygulanmasındaki amaç, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözülemeyen veya çözümü geç olan problemlere çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olmaktır.

Biyoteknolojik yöntemler sayesinde, belirli bitki genotiplerinin veya ekonomik değeri yüksek olan bitki türlerinin çok kısa bir sürede çoğaltılmaları, ekonomik değeri yüksek olan bazı bitkisel sekonder ürünlerin elde edilmesi, yeni bazı karakterlerin daha kesin bir şekilde kombine edilmesi, büyük populasyonlardan belirli genotiplerin seleksiyonu ve belirli bir karakterin izole edilmiş gen halinde bir genotipe direkt olarak aktarılması mümkün olabilmektedir.

2.1. Bitki Biyoteknolojisinin Tarihsel Gelişimi:

Bitki biyoteknolojisinin temelleri, 1838 yılında **Schwann** ve **Schleiden**'in totipotens teorisi ile atılmıştır. Bu teoriye göre, hücrelerin otonom üniteler oldukları ve tek bir hücreden itibaren tam teşekküllü bir canlı gelişebileceği iddia ediliyordu. Bu totipotens teorisine göre bütün hücreler, tüm canlıyı oluşturma özelliklerini, çekirdeklerindeki genetik cephaneliklerinde muhafaza etmektedirler.

1902 yılında Alman bilim adamı **Haberland**, bitki dokularını suni besi ortamlarında yetiştirmeyi denemiş ancak bu deneme başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Ancak bitki doku kültürleri anlayışı ortaya çıkmıştır.

1921 yılında **Molliard**, bitki embriyolarını suni besi ortamlarında sınırlı ölçüde geliştirmeyi başarmıştır.

1925 yılında **Laibach**, *Linum* türleri arasındaki melezlemelerden elde edilen embriyoları, suni besi ortamlarında yetiştirmeyi ve bunlardan melez bitkiler elde etmeyi başarmıştır.

1934 yılında **White**, şeker, inorganik tuz ve bira mayası bulunan besi ortamında kültüre aldığı domates kök uçlarının aktif bir şekilde geliştiğini saptamıştır.

1939 yılında **Nobecourt**, sürekli büyüme gösteren organize olmamış doku (kallus) kültürlerini elde etmeyi başarmıştır.

1946 yılında **Ball**, ilk defa sürgün uçlarının *in vitro* kültüründen tam teşekküllü lüpen (*Lupinus*) ve latin çiçeği (*Tropaeolum*) bitkilerinin rejenerasyonunu gerçekleştirmiştir.

1952 yılında **Morel** ve **Martin**, meristem kültürü yoluyla ilk olarak, virüsten arındırılmış *Dahlia* bitkilerini elde etmişlerdir.

1953 yılında **Tulecke**, japon eriği (*Ginko biloba*) bitkisinin polenlerini suni besi ortamında kültüre alarak ilk defa haploid kallus elde etmeyi başarmıştır.

1954 yılında **Muir** ve **ark.**, ilk defa suni besi ortamında tek hücreden tam teşekküllü bir bitki elde etmeyi başarmışlardır.

1955 yılında **Miller** ve **ark.**, hücre bölünmesini teşvik eden bir hormon olan kinetini keşfetmişlerdir.

1957 yılında **Skoog** ve **Miller**, bitkilerde organ oluşumunun sitokinin/oksin oranına bağlı olduğunu saptamışlardır.

1958 yılında **Reiner** ve **Stewart**, havuç kallus ve hücre kültürlerinde somatik embriyoların oluşumunu saptamışlardır.

1959 yılında bitki doku kültürleri ile ilgili ilk bilimsel eser **Gautheret** tarafından yayınlanmıştır.

1962 yılında **Murashige** ve **Skoog**, günümüzde de en fazla kullanılan besi ortamı olan suni besi ortamını geliştirmişlerdir.

1964 yılında **Guha** ve **Maheshwari**, *Datura* bitkisinden, anter kültürü ile ilk haploid bitkileri elde etmişlerdir.

1969 yılında **Erikson** ve **Jonassen**, *Hapopappus gracilis* bitkisinin süspansiyon kültürlerinden ilk defa başarılı bir şekilde protoplast izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

1971 yılında **Tabeke** ve **ark.**, ilk defa bitki protoplastlarından, bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişler.

1972 yılında **Carlson** ve **ark.**, farklı tütün türlerinin protoplastlarını birleştirerek ilk somatik melezlemeyi gerçekleştirmişlerdir.

1977 yılında **Chilton** ve **ark.**, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinden Ti-plazmid DNA'sını bitkilere aktarmayı başarmışlar.

1978 yılında **Melchers** ve **ark.**, domates ve patetes bitkilerinin protoplastlarını birleştirerek, ilk defa cinsler arası somatik melezleri elde etmişlerdir.

1982 yılında **Zimmermann**, ilk defa elektrik şokundan yararlanarak, protoplast füzyonunu gerçekleştirmiştir (**Hatipoğlu, 1997**).

2.2. Bitki Biyoteknolojisinde Kullanılan Yöntemler

Protoplast kültürü

1. Protoplast füzyonu
2. Transformasyon

Kallus kültürü

1. Mikroçoğaltma
2. Somaklonal varyasyon
3. Somatik embriyogenes
4. Sentetik tohum
5. Sekonder bileşikler

Meristem kültürü

1. Mikroçoğaltma
2. Virüsten arındırma

2.2.1. Mikroçoğaltma

Bitki doku kültürü tekniği, daha az zaman, yer ve materyal kullanılarak aynı genetik karakterleri taşıyan milyonlarca bitkinin üretilmesini olanaklı kılar. Bu olay **mikroçoğaltma** olarak bilinir. Bu durumda en çok kullanılan teknik, meristematik

dokuların, içinde apikal dominansiyi engelleyen ve lateral tomurcukların gelişmesine olanak sağlayan bileşiklerin bulunduğu besi ortamına bırakılmasıdır. Lateral tomurcukların gelişmesi ile oluşan genç sürgünler, bu ortamdan alınarak kök ve gövde gelişimini uyaran ikinci bir kültür ortamına aktarılır.

Mikroçoğaltma tekniği, 1970 yılından sonra orman ağacı türlerinin üretiminde yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikle oluşan yeni bitkiler, adventif tomurcuk ve aksiller tomurcuk kültürlerinden başlatılır. Yeni tomurcukların farklılaşması ve kalluslaşması nadiren kullanılır. Mikroçoğaltma tekniği elma (*Malus*), şeftali (*Persica vulgaris*) ve armutta (*Pyrus communis*) başarılı bir şekilde uygulanmıştır (**Özen, H.Ç., Onay, A.,1999**).

Coffin ve ark. (1976), *Prunus cerasus*'un vejetatif dokularından kallus elde edildiğini bildirmişler. Araştırmacılar, kallus kültürünün internodal eksplantlardan (1-2 cm) başlatılabildiğini ve 0.2 mg/l kinetin ile, 0.25 mg/l 2.4-D'nin bulunduğu modifiye MS besi ortamında geliştiğini rapor etmişlerdir.

D'Amato (1977), *in vitro* şartlarda vejetatif üretimde, diğer bitki kısımları yerine, meristemlerin kullanımının tercih edildiğini bildirmiştir. Bunun nedeni, diploid bir bitkide apikal meristemin yeknesak diploid hücrelere sahip olmasıdır. Zira, bitkinin dokularında farklı seviyelerde poliploid hücrelerin bulunması nedeni ile bu dokuların kültüründen elde edilecek bitkilerin poliploid olabilme ihtimali yüksektir. Oysa meristem kültürü ile elde edilen bitkiler, ana bitkinin genetik karakterini aynen taşımaktadırlar.

Zhuan (1980), malta eriğinin (*Eriobotrya japonica* Lindl) zigotik embriyolarını kullanarak mikroçoğaltmayı başarmış. Tozlaşmadan 2 ay sonra zigotik embriyoları, 500 LH+0.2-0.5 NAA+1-3 mg/l BA içeren MS besi ortamında kültüre alarak karanlıkta gelişmeye bırakmış. Kültürün 3. günü embriyoda yavaş yavaş hacim artışı olduğunu ve kotiledonların açıldığını tespit etmiş. Kotiledonlardan plumulanın büyümeye başlamasıyla zigotik embriyoları ışıklı ortama aktardığını bildirmiştir. Işıklı ortamda plumula ve kotiledonların hızlı bir şekilde büyüdüğünü ve sürgünlerin geliştiğini tespit etmiştir. 0.2 mg/l NAA-3.0 mg/l BA içeren MS besi ortamında kültüre aldıkları zigotik embriyoların %70'nin sürgün oluşturduğunu ve %40 oranında yan sürgün verdiğini rapor etmiştir.

Başaran (1980), tarafından *Nicotiana tabacum* L.cv.Siirt anter kültürlerinden n ve 2n kromozomlu homozigot diploid fertler elde edilmiştir.

Sert çekirdekli meyveler grubuna giren vişne (*Prunus serotina*)'nin *in vitro* mikroçoğaltılması ile ilgili çalışmalar 1980'lere kadar rapor edilmemiştir. **Riffaud ve**

Cornu (1981) tarafından vişnenin bir çeşidi olan mazzardin mikroçoğaltılmasının başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Yang ve ark. (1982, 1983), malta eriğini (*Eriobotrya japonica* Lindl) hızlı bir şekilde çoğaltmak için sürgün ucu kültürünü kullanmışlar. 0.5 mg/l BA +0.1 mg/l NAA +0.2mg/l GA ve %2 sakkaroz içeren MS besi ortamında sürgün uçlarını kültüre alarak çoğaltmayı başarmışlar. Kültüre aldıkları sürgünleri büyüme odasında 25 °C sıcaklıkta ve ışiksiz ortamda 20-30 gün beklettikten sonra ışıklı ortama almışlar. Daha sonra sürgünlerin mikroçoğaltılmasında optimum BA oranını araştırmışlar ve 1.5-2.0 mg/l BA'da sürgün çoğalmasının en iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Ho (1983), malta eriğinin (*Eriobotrya japonica* Lindl) 1-7 mm uzunluğundaki genç embriyolarını, 0.5-2.0 mg/l 2.4-D ve 0.05 –0.2 mg/l BA içeren MS besi ortamında kültüre aldığını bildirmiştir. Araştırmacı, somatik embriyo elde etmek için embriyojenik kallus oluşturmuş ve somatik embriyoların, BA ve düşük miktarlardaki 2.4-D'li besi ortamında bitkicikler oluşturduğunu rapor etmiştir.

Ho (1983), malta eriğinin (*Eriobotrya japonica* Lindl) 2 mm boyundaki meristemlerini 0.5-2.0 mg/l 2.4-D ve 0.05-0.2 mg/l BA içeren MS besi ortamında kültüre aldığını ve embriyojenik kallus elde ettiğini belirtmiş. Daha sonra aynı besi ortamını kullanarak embriyo elde etmiş. Kallustan somatik embriyo oluşumunun 2.4-D'nin miktarıyla ilişkili olduğunu tespit etmiş. 2.4-D'nin düşük miktarları embriyo oluşumunu teşvik ederken yüksek miktarının kallus oluşumunu arttırdığını bildirmiştir.

Pistacia vera L. ve diğer bazı *Pistacia* türleri ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarda, bitki çoğaltımı için eksplant olarak 10-12 günlük fide ve 1-4 yaş arası ağaçlardan alınan sürgün uçları ve nod tomurcuk segmentleri kültürün başlatılması için kullanılan ana eksplant kaynakları olmuştur (**Barghchi ve Alderson, 1983; Barghchi,1985a; Barghchi ve Alderson, 1985; Pontikis, 1984**). Nod tomurcuk segmentleri ile sürgün ucu kültürlerinin tesisi karşılaştırıldığında, sürgün ucu kültürlerinin apikal dominansi yönünden daha güçlü olduğu gözlenmiş, fakat bu fark takip eden alt kültürlerde kalkmıştır (**Barghchi,1985b; Barghchi ve Alderson, 1985**).

Çok sayıda sürgün üretimi için BAP'lı ortam, kinetinli ortama göre daha etkili bulunmuş ve 4 mg/l BAP'ın *P.vera* fide eksplantlarından sürgün üretimi için optimal olduğu, **Barghchi ve Alderson (1983)** tarafından rapor edilmiştir. **Martinelli (1988)** 1-4 yaş arası *Pistacia* materyallerini düşük BAP konsantrasyonlarında kullanmıştır.

Tricoli (1983), Tricoli ve ark. (1985), tarafından vişnenin mikroçoğaltılmasının başarılı olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar, Jones ve arkadaşlarının elma, kiraz ve eriğin mikroçoğaltılması için geliştirdikleri besi ortamının vişne için de uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bu besi ortamı, MS tuzları ile 0.4 mg/l thiamin HCl, 100 I inositol, 1.0 mg/l BA, 0.1 mg/l GA3, 0.1mg/ IBA ve %2 sakkaroz içermektedir.

Yine aynı araştırmacı vişnenin mikroçoğaltılmasında 1/1 MS'in ve büyüme düzenleyicilerinden BA'nın en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir. 0.75 mg/l BA bulunan besi ortamında kültüre alınan sürgün uçlarının çoğaltılmasında en iyi sonuç alınırken BA 0.50 mg/l'ye düşürüldüğünde, sürgün oluşumunun azaldığını bildirmiştir. 1.0 mg/l BA'da ise tomurcuk çoğalması artarken sürgün uzamasının azaldığını rapor etmişlerdir (**Tricoli 1983**). **Yenikeyev ve ark. (1984)**, tozlaşmadan 20-30 gün sonra izole ettikleri kiraz eriği embriyolarını, farklı büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu MS ortamında geliştirerek köklü bitki oluşturduklarını bildirmişler. Kinetin, BA ve GA'nın sürgün gelişimini teşvik ettiğini, IAA'in ise köklenmede kültür besi ortamına ilave edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Embriyoların soğuklama ve olgunlaşma aşamaları olmaksızın kültürde hızlı bir şekilde geliştiğini ve birkaç ay içinde tarlaya aktarılabilir hale geldiğini rapor etmişlerdir.

Maynard (1986), orman ağaçlarının çoğunlukla yabancı populasyonlar oldukları için kendi doğal ortamlarında çok az değişerek büyüdüğünü ve doku kültürü teknikleri ile yapılacak çoğaltmanın, bunların evcilleştirilmelerindeki gelişim süreçlerini kısaltacağını bildirmiştir.

Hall (1987), *in vitro* şartlarda elde edilen vişne sürgünlerinin yaprak ve gövde segmentlerinden kallus oluşturduğunu rapor etmiştir. Kallus oluşumunun 10 yada daha fazla alt kültür süresince devam ettiğini ve ilk alt kültürde yaprak eksplantlarından oluşan kallusun sürgün verdiğini bildirmiştir. Oluşan bu sürgünlerin köklenme, adaptasyon ve tarlaya aktarma çalışmalarında kullanıldığı ve tarlaya aktarılan bitkilerin morfolojik olarak sürgün ucundan ve tohumdan oluşan bitkilerden farklı olmadığını rapor etmiştir.

Ochatt ve Power (1988), *Prunus cerasus*'un iki farklı çeşidinin (CAB4D ve CAB5H) çeliklerinden mesofil protoplastlarını izole ederek, %9 manitol ve büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu temel MS besi ortamında kallus ve zeatin ile bitki rejenerasyonunu gerçekleştirebilmişlerdir.

Maynard ve ark. (1991), *in vitro* ortamda geliştirilen vişne sürgünlerinin alt kültürünün 4-6 haftada bir yapılması gerektiğini, alt kültür geciktiğinde ise gelişen

sürgünlerin yapraklarında sararma, sürgün ucu nekrozu ve besi ortamına fenolik bileşiklerin salındığını bildirmişlerdir.

Başaran ve ark. (1991), *Nicotiana rustica* gibi otsu bitkilerin pistillerinden somatik embriyolar elde etmişlerdir.

Yücel ve ark. (1991), *Pistacia vera* L. bitkisinin nodal ve apikal tomurcuklarından itibaren mikroçoğaltma çalışmaları yaparak, *in vitro* şartlarda sürgünler ve rizogenik faaliyetler gerçekleştirmişlerdir.

Yücel ve ark. (1992), *Nicotiana rustica*'nın pistillerinden itibaren *in vitro* şartlarda MS kültür besi ortamında IAA etkisi ile n ve 2n kromozomlu bitkiler elde etmişlerdir.

Çolak (1994), yaptığı doktora tez çalışmasında, 1 mg/l IAA + 2 mg/l kinetin içeren MS besi ortamında kültüre aldığı *Impatiens walleriana* var. Sultanii gövde parçalarından mikroçoğaltma ile 1 kültür periyodu içerisinde 1260 adet bitki elde ettiğini rapor etmiştir.

Yine aynı araştırmacı, 1 mg/l IAA + 2 mg/l kinetin içeren MS çözeltilerinde kültüre aldığı *Nicotiana rustica* L. anterlerinden n kromozomlu haploid ve 2n kromozomlu homozigot diploid fertler elde ettiğini ve IAA (3 mg/l) miktarını kinetine göre (1 mg/l) daha fazla içeren MS çözeltilerinde kültüre alınan *Nicotiana rustica* L. gövde parçalarında yalnızca kallojenik faaliyetlere tanık olduğunu, hiçbir zaman kolojenez olayına rastlanmadığını belirtmiştir.

Taşkın (1995), doktora tezinde, *Pistacia vera* L.cv. Siirt (Antep fıstığı) bitkisinin çeşitli doku ve organlarından *in vitro* koşullarda doku kültürü teknikleri ile fide elde edilme imkanlarını araştırmıştır. Yaptığı çalışmada, *in vitro* şartlarda çimlendirmiş olduğu tohumdan gelişen fidelerin epikotil, nod ve sürgün ucu bölgelerinden aldığı explantları MS besi ortamında kültüre almış. 2 mg/l BAP içeren MS besi ortamının sürgün gelişimi ve çoğaltımı için uygun olduğunu belirlemiş. Olgunlaşmamış embriyoların 2 mg/l kinetin + 2x10 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamında bitkiciklere dönüştüğünü belirtmiştir.

Pistacia vera L.cv. Siirt'in olgunlaşmamış tohumlarından somatik embriyolar elde etmek amacıyla, zigotik embriyolar ve kotiledon eksplantlar izole edilerek, sıvı ve agarlı MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Bunlardan gerçek anlamda somatik embriyolar 1.5 mg/l NAA içeren agarlı MS ortamlarında ve kotiledon eksplantlarından direkt olarak meydana gelmiştir. Somatik embriyoların daha sonra 1.5 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamlarında ve 1 mg/l GA3 +600 mg/l L-Glutamin içeren agarlı MS ortamlarında çimlendirilmesi ile bitkiciklere dönüşmesi sağlanmıştır.

Namlı (1995), *Vitis vinifera* L.cv. Cardinal asma varyetesinde, çeşitli organlarından itibaren litrede 2 mg BAP içeren ve 1/2 oranında sulandırılmış MS besi ortamını kullanarak mikroçoğaltmasını sağlamış ve keza ilk kez dişi organ ovaryumlarından *in vitro* şartlarda çekirdeksiz üzüm elde etmiştir.

Onay ve ark. (1995), 200 mg/l hidrolize-kazein ve 114 µM 1-askorbik asit ve BAP ile desteklenen sıvı MS besi ortamında kültüre aldıkları olgunlaşmamış Antep fıstığı çekirdeklerinden embriyojenik doku elde etmişlerdir. Eksplantları kültüre aldıktan 2 hafta sonra 8.9 µM BAP'lı sıvı MS besi ortamında direkt olarak yoğun embriyojenik kütlelerin farklılaştığını bildirmişlerdir. Farklılaşan embriyojenik dokuları 4.4 µM BAP'lı besi ortamına aktararak somatik embriyolar elde etmişlerdir. Daha sonra oluşan somatik embriyoları büyüme düzenleyicileri olmayan katı MS besi ortamında kültüre alarak bitkilerin oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Taşkın (1996), *Pistacia vera* L.cv. Siirt (Antep fıstığı) sürgünlerinde rizogenez faaliyetlerini araştırmıştır. Temel besi ortamı olarak modifiye edilmiş MS besi ortamına farklı konsantrasyonlar da IBA, NAA ilave etmiş ve köklenmeye etkilerini araştırmıştır.

Onay (1996), Antep fıstığının (*Pistacia vera* L.cv.) yaşlı ağaçlarından, fidelerinden, olgun meyvelerinden, zigotik embriyolarından ve genç yaprak eksplantlarından somatik embriyogenesis ve organogenesis çalışmaları için bir metot geliştirmiştir. Çeşitli oksin ve sitokininler kullanarak yaşlı ağaçlardan aldığı değişik organlardan bitki rejenerasyonunu başarak, ayrıca BAP içeren sıvı MS besi ortamında somatik embriyolar elde ettiğini rapor etmiştir.

Işıksalan (1997), *Vitis vinifera* L.cv. Alphonse asma çeşidinin değişik organlarından itibaren mikroçoğaltma olanaklarını araştırmıştır. Ayrıca, 2 mg/l BAP'lı MS besi ortamında kültüre aldığı çiçek durumlarından itibaren yoğun kallus oluşumuna tanık olmuş ve aynı besi ortamında kallustan itibaren sürgün elde ettiğini bildirmiştir. Ovaryumlarından hormon kökenli meyveler elde etmiştir.

Işıksalan ve ark. (1998), *Vitis vinifera* L.cv. Alphonse asma çeşidinin lateral tomurcuklarının proliferasyon kapasitelerinin, yılın değişik zamanlarına göre *in vitro* şartlarda karşılaştırılması araştırmalarını yapmışlardır. Bir yıllık zaman periyodu içinde 2 mg/l BAP'lı ve 1/2 oranında sulandırılmış MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcuklardan, köklü fideler elde ederek, en sağlıklı ve verimli fideciklerin Kasım ve Aralık ayları içerisinde kültüre alınan materyallerden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Adıyaman (1998), *Vitis vinifera* L.cv. Perle de Csaba'nın lateral tomurcuklarını, litrede 2 mg BAP bulunan 1/2 MS besi ortamında kültüre almış. Buna göre, lateral tomurcukların izole edildiği aylara göre, Kasım, Aralık ve Ocak aylarında oldukça iyi geliştiğini ve Aralık ayında kültüre aldığı tomurcuklardan %80'lik verim elde ettiğini rapor etmiştir. Keza, Namli'nin (1995) Cardinal ovaryumlarıyla ilgili çalışmalarını Perle de Csaba'da gerçekleştirmiştir.

Namli ve ark (1999), 1/2 oranında sulandırılmış MS besi ortamında, *Vitis vinifera* L.cv. Cardinal asma çeşidinin pistillerinden itibaren litrede 2 mg BAP'ın etkisi ile 2 ve 3 karpelli partenokarpik üzümler oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Onay (2000), 100 mg/l hidrolize kazein, 100 mg/l 1-askorbik asit ve BAP ile desteklenen sıvı MS besi ortamında kültüre aldığı *Pistacia atlantica*'nın tohumlarından embriyojenik doku rejenerasyonu ettiğini bildirmiştir. Embriyojenik dokuları sıvı besi ortamında BAP (0.5-4.0 mg/l) ile birkaç alt kültür sonrasında tohumdan direkt olarak somatik embriyolar elde ettiğini bildirmiştir. Olgunlaşmamış somatik embriyoları bitki büyüme düzenleyicisi olmayan katı MS besi ortamında çimlendirerek fideler elde ettiğini rapor etmiştir.

Onay (2000), BAP ile desteklenen MS besi ortamında, *Pistacia vera* L.'nin yaşlı ağaçlarından aldığı nodal tomurcuklardan itibaren sürgün çoğaltılmasını gerçekleştirmiştir. *in vitro* proliferasyonu ettiği sürgünlerin, sürgün uçlarını kullanarak, 8.8 µM BA içeren katılaştırılmış MS besi ortamında maksimum sürgün oluşumu elde ettiğini bildirmiştir. Mikro sürgünleri, IBA içeren MS besi ortamında köklendirerek toprağa adaptasyonlarını gerçekleştirmiştir. Daha sonra toprağa adaptasyonlarını yaptığı bitkileri seraya aktardığını rapor etmiştir.

2.2.2. Virüsten Arındırma

Virüs enfeksiyonu birçok bitkide verimin azalmasına neden olur. Virüs enfeksiyonuna uğramış olan bitkiler çelikleme gibi yöntemlerle vejetatif olarak çoğaltılmak istenirse, çoğaltılan her bitki ana bitkiden gelen virüsü içerir. Buna karşılık bitkiler mikroçoğaltma yöntemi ile çoğaltıldığında, hem sterilizasyonun etkisi ile hem de virüs içermeyen organlardan (kök ve gövde ucu) alınmış dokuların kullanılması nedeni ile oluşan yeni bitkide virüs bulunmaz veya yok denecek kadar az bulunur (**Özen ve Onay 1999**).

Virüsten arı bitkilerin elde edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (**Debergh ve ark. 1990, George 1993, Sherwood 1993, Nehra ve Kartha 1994**).

Meristem ucu kültürü, sıcaklık uygulaması (termoterapi), meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması, kimyasal madde kullanımı (kemoterapi), soğuk uygulaması (kryoterapi), mikro aşılama, virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi, virüsten ari diğer bitkilerin kullanılması.

Bitki doku kültürlerinde görülen üç çeşit kontaminasyondan biri olan akut kontaminasyonun giderilmesinde yüzeysel sterilizasyonun önemi bilinmektedir. Eksplant içerisinde gizli bulunan (endojen) mikroorganizmaların sebep olduğu diğer kontaminasyonlarda ise mikroorganizmaların belirlenmesi ve giderilmesinin de güç olduğu bilinmektedir. İşte meristem kültürü tekniği, virüsten ari bitkilerin elde edilmesi amacının yanı sıra donör bitkinin bakteriyel ve fungal patojenler ile enfekte olduğu durumlarda da avantaj sağlamaktadır. Çünkü bitkide terminal bölgenin vasküler farklılaşma bölgesinin üst kısmı patojenik partikülleri pek içermez. Bu nedenle, eğer virüs ile bulaşık olan bir bitkiden, söz konusu bu bölgeden küçük bir eksplant alınıp *in vitro* da başarılı olarak geliştirilirse patojensiz bitki elde edilmesi mümkün olmaktadır (**George 1993**). Bu nedenle bir veya birden fazla meristem ucu veya sürgün ucu kültürü uygulamasından sonra sürgünler mikroorganizmalardan arındırılmış olmaktadır. Mikroçoğaltma, hastalısız yapıları ticari amaçla üretmek, diğer patojenleri ve virüsleri ise bertaraf etmek için etkili bir yoldur. Son 50 yıldan bu yana virüs ile enfekte edilmiş bitkilerin, virüslerden arındırılmasında ve virüssüz klonların çoğaltılmasında meristem kültürleri kullanılmaktadır (**Wang ve Hu 1980, George ve Sherrington 1984**).

Boxus ve Druart (1986), sürgün ucu ve meristemlerin virüssüz bitki rejenerasyonunda kullanılmasının en iyi eksplantlar olduğunu bildirmişlerdir. Eksplant büyüklüğünün, virüsleri elimine etmede en önemli faktörlerden biri olduğunu savunan araştırmacılar, eksplant boyu küçüldükçe elde edilen sonucun daha iyi olduğunu saptamışlardır. Bunun yanında, virüs çeşidi ile bitki türünün virüs eliminasyonunda daha az önemli olduğunu rapor etmişlerdir.

2.2.3. Sentetik Tohumlardan Bitki Üretimi

Sentetik tohum, doku kültürü yöntemi ile elde edilen somatik embriyoların jelatin kapsüller içine konulması ile oluşan yapılardır. Ekonomik bitki türlerinin daha az masrafla çoğaltılmasını sağlayan sentetik tohum teknolojisinde, aynı klondan elde edilen somatik embriyoların bir kısmı tarlaya ekilirken, geri kalan kısmı ise sentetik tohum halinde bekletilir. Tarla şartlarında kalitatif ve kantitatif olarak en iyi gelişen bitkiciğin köken aldığı klonlar çoğaltılarak seri üretim yapılabilir.

Sentetik tohumların bitki ıslahındaki faydaları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- İstenilen nitelikte ürün veren bitkiler hızlı fide-fidan üretimiyle çoğaltılır.
- Bitkilerde genetik düzenlilik sağlanır.
- Vejetatif yolla çoğaltma işleminden daha az masraflıdır.
- Aseptik ürün elde edilir.
- Doku kültürü yönteminde, tüpte gelişen bitkilerin tarlaya aktarılmadan önce yapılması gereken bazı uyum çalışmaları, sentetik tohum üretiminde yoktur.
- Sentetik tohum ile yapılan işlemler normal tohumla yapılan işlemler kadar kolaydır.
- Sentetik tohum, uygun ortamlarda uzun süre saklanabilir (**Özen ve Onay 1999**).

Onay ve ark (1996), fıstığın (*Pistacia vera* L.) olgunlaşmamış meyve kültüründe embriyojenik doku parçaları elde ederek bunları kalsiyum alginat içine kapsül şeklinde yerleştirdiklerini bildirmişler. Ayrıca oluşan somatik embriyoları da kalsiyum alginat içine ayrı ayrı kapsülleyerek sentetik tohum elde etmişlerdir. Kapsül halinde paketlenen somatik embriyo ve embriyojenik dokuların canlılığını koruyabilmesi için 4 °C'de 60 gün boyunca muhafazaya almışlar. Muhafaza ettikleri embriyojenik dokuları 2 ay sonra alt kültüre alarak faaliyete geçme kapasitelerini test etmişler. Sonuçta, kapsüllenmiş dokuların canlılığını devam ettirdiğini, bunun yanında kapsüllenmemiş dokuların yeniden faaliyete geçmediği gözlenmiştir. Kapsüllenen sentetik tohumların %14.5'nin bitki fidelerine dönüştüğünü rapor etmişlerdir.

2.2.4. Protoplast Füzyonu

Protoplastlar, bitki biyoteknolojisinde (özellikle gen transferinde) kullanılan temel başlangıç materyalleridir. Herhangi bir bitki hücresinden elde edilen protoplast bölünme yeteneğine sahiptir. Önlem alınmazsa parçalayıcı enzimler ile hücre duvarı uzaklaştırılan protoplastlar belli bir süre sonra besi ortamında yeniden hücre duvarı geliştirirler ve bölünerek kallus oluştururlar. Protoplast füzyonunda iki protoplast direkt olarak etkileşir ve birbirinin içine girer. Bu birleşme **Somatik hibridizasyon** olarak da bilinir. Anadan gelen genetik karakterler yanında bazı yeni melez karakterler de gelişir. Bu durum genetik olarak uyumsuz olan türler arasında melez bireylerin gelişmesine olanak sağlar. Ayrıca protoplast füzyonu, geleneksel üretimde pahalı ve çok zaman isteyen geri çaprazlama yönteminin kolayca yapılmasına olanak sağlar (**Özen ve Onay 1999**).

2.2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi

DNA'nın rekombinasyonu; bir genomdan alınan DNA parçalarının diğeri bir genomun DNA yapısının içine sokulmasıdır. Bu teknikle somatik hücrelerin melezleştirilmesi ve genetik olarak uyumsuz olan türler arasındaki melezleme işlemleri kolaylıkla yapılmaktadır. DNA'nın rekombinasyonu çok eskiden beri bilinen bir konudur. Doğal olarak oluşan DNA rekombinasyonu genellikle aynı hücre içinde gerçekleşmektedir. Bundan dolayı doğal rekombinasyon genetik bilginin değişmesi üzerinde çok az etkili olur.

Geliştirilen yeni **rekombinant DNA teknolojisi** doğal ve sentetik engellerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir tekniktir. Genellikle *in vitro* olarak gerçekleştirilen bu olay farklı türlerin DNA'larının birleşmesine olanak sağlar.

Genetik manipulasyonlarla konakçı DNA'sına aktarılabilecek genlerin seçimi de söz konusudur. Bu şekilde belli teknikler kullanılarak bir genome yabancı bir gen parçasının aktarılmasıyla oluşturulan bitkiler **transgenik bitki** adını alır. Genetik manipulasyonlarla istenilen genler ve bunlara ait özelliklerin diğeri bitkilere aktarılması pazar, manav ve marketlerde yeni özellikler taşıyan sebze ve meyveleri, çeşitli hastalıklara dirençli endüstri ve tahıl bitkilerinin bulunmasına olanak sağlayacaktır.

Transgenik bitkileri elde etmek için genetik mühendisliği yöntemlerini kullanarak (rekombinant DNA teknolojisi), bitkilere yeni karakterleri kazandıracak genlerin transfer edilmesi gerekir. Bu amaç için iki temel yöntem kullanılmaktadır:

1. *Agrobacterium* aracılığı ile hücrelere gen transferi
2. Protoplastlara gen transferi (**Özen ve Onay, 1999**).

2.2.6. Somaklonal Varyasyonlar

Doku kültürü tekniği ile elde edilen fidelerin biri birine benzer somatik hücrelerden klonlandığı gerçeğine rağmen, rejenerasyon olan bitkiler, morfolojik ve fizyolojik bakımdan önemli değişiklikler gösterebilirler. Hücre kültürlerinde gelişen bitkilerde meydana gelen genetik değişiklikler **somaklonal varyasyonlar** olarak tanımlanır. Somaklonal varyasyon, birbirinden az da olsa değişik karakterler gösteren klonların farklı hastalıklara karşı direnç göstermeleri açısından pratik bir değere sahiptir. Bitki ıslahçılarında önemli kolaylıklar sağlayan bu varyasyonlar bir çok bitki türünde saptanmıştır (patates, tütün, şeker kamışı, soğan).

Bazı durumlarda, somaklonal varyasyon gösteren türlerin diğeri bitkilere göre daha iyi karakterler gösterdikleri saptanmıştır. En önemli gözlemlerden biri, artan dirençliliğin

sonraki jenerasyona aktarılmasıdır. Bu durum, doku kültürünün neden olduğu değişikliklerin kalıcı olabildiğini göstermektedir.

Somaklonal varyasyonlar her zaman sabit değildir. Yeni rejenere olan bitkilerde mevcut karakterler, daha sonraki nesillerde aşamalı olarak kaybolabilir. Doku kültürü sırasında oluşan varyasyon, bitki hücre kültürleri aracılığıyla ilaç elde etmeyi amaçlayan endüstriyel programlar için kullanılabilir (**Özen ve Onay 1999**).

2.2.7. Bitki Hücre Kültürleriyle Sekonder Bileşiklerin Üretimi

Bitkiler karbonhidrat, yağ ve protein gibi primer bileşikler yanında, genellikle tatlandırıcı, farmasötik, kozmetik v.s. özellikler gösteren sekonder bileşikleri de sentezlerler. Bitkiler, sekonder bileşikleri özellikle çevre faktörlerine cevap olarak sentezlenirler. Birçok değerli kimyasal bileşik, gerek farmasötik ve gerekse endüstriyel kullanım için, bitki doku kültürleri yoluyla *in vitro* şartlarda üretilebilirler.

Bitkilerden elde edilen ilaç niteliğindeki maddelerden en önemlileri; kodein, atropin ve digoksendir. Bitkilerden elde edilen diğer bazı kimyasal maddeler arasında tat, koku ve lezzet verici olanlar önemli yer tutarlar. Yasemin (parfüm) *Jasminum* türünden, doğal bir insektisit olan piretrin *Chrysanthemum cinerariaefolium*'dan ve atropin, güzel avrat otu olan *Atropa belladonna*'dan elde edilmektedir. Bunları bitkilerden elde etmek oldukça zor ve pahalıdır. *In vitro* hücre kültürleri yapılarak bu maddelerin daha ucuz ve bol olarak üretilmesi mümkündür. Bitkiler tarafından sentezlenen ve ekonomik öneme sahip olan bu bileşiklerin elde edilmelerinde hücre süspansiyon kültürleri, etkili olarak kullanılan yöntemlerden birisidir (**Özen ve Onay 1999**).

Ishiguro ve ark. (1999), *Hypericum patulum*'un süspansiyon hücre kültüründen iki yeni ksanton glikosid; patulosid-A ve patulosid-B izole etmişlerdir.

Sökmen ve ark. (1999), Doku kültürü yöntemi ile çoğaltıp yetiştirdikleri *Hypericum capitatum*'un MeOH özütünün düşük oranda HIV-I'e karşı antiretroviral aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

Kartnig ve ark. (1996), *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum*, *Hypericum tomentosum*, *Hypericum bithynicum*, *Hypericum glandulosum* ve *Hypericum balearicum*'u doku kültürü yöntemi ile çoğaltmışlar ve değişen miktarlarda hiperisin, psödohiperisin, flavonoid, monomerik kuersetin türevleri ve apigenin türevleri izole etmişlerdir.

2.3. Badem İle İlgili Bazı Çalışmalar

Rosaceae familyasının bir üyesi olan bademin (*Amygdalus communis* cv. Nonpareil) anavatanı orta ve batı Asya'dır. Buradan Çin, Hindistan, İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine yayılmıştır. Özellikle Ege, Akdeniz ve Anadolu bu bitkinin gen merkezleridir.

Dünyada badem üretimi 1.631.844 ton olup, Türkiye bu üretim içerisinde 34.000 ton ile ABD, İspanya, İtalya, Fas, Suriye, Tunus, Pakistan ve Yunanistan'ın arkasından gelerek 1999 yılında 9. sıraya düşmüştür. DİE Tarım istatistikleri özetine göre, Türkiye'nin badem üretimi 1998 yılında 36.000 ton olmuştur.

Yabancı kökenli olan Nonpareil (el bademi), oldukça ince kabuklu olup verimi yüksektir. Birçok badem çeşidinde olduğu gibi Nonpareil de kendi ile uyumsuz olduğu gibi karşılıklı uyumsuzluk durumu da görülür ve yabancı tozlaşma ister. Bu nedenle ürün vermeyen ağaçların yeniden yada en az iki çeşit ile plantasyonu yapılmaktadır. Bu durum badem bahçelerinin masraflı ve geç yetişmesine neden olmaktadır (**Küden ve Küden 2000**).

Prunus cinsi odunsu ağaçlar, klonal çoğaltılması gereken ve ekonomik öneme sahip birçok meyve türü içerir. Bu nedenle *Prunus* türlerinin mikroçoğaltılmasındaki başarılı ilerlemeler, badem için uygun mikroçoğaltma tekniklerinin gelişmesinde yardımcı olur. Bugün çoğu *Prunus* türleri için virüsten arındırma, mikropropagasyon ve embriyo kültürleri için bazı teknikler rapor edilmiştir.

Zdruikovskaya ve Rikhter (1972) tarafından, *in vitro* laboratuvar tekniği ile modifiye White besi ortamında, bir badem embriyosundan iki bitki elde edilmiş. 1980'li yıllarda yine White besi ortamında, Nikitskii cv. nin olgunlaşmamış embriyosundan benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Mehra ve Mehra (1974), 1/2 modifiye MS besi ortamında badem eksplantlarından alınan parçalarla organogenezisi başarmışlar. Ayrıca 2 mg/l NAA ve %10 coco sütü ilave edilmiş modifiye MS besi ortamının köklenme ve bitkinin hipokotil kısımları için etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Badem X şeftali hibridi ve badem klonlarından sürgün ucu kültürleri ile çalışan **Kester ve ark. (1977)**, **Tabachnik ve Kester (1977)** bademde bazı somatik varyasyonları özellikle Nonpareil çeşidindeki genetik düzensizlikleri tespit etmek ve izoenzim çalışmalarında köklerini kullanmak için sürgün ucu kültürünü bir araç olarak kullanmışlar. **Tabachnik ve Kester (1977)** badem ve badem X şeftali hibridinin dormant haldeki sürgün

tomurcuklarını %0.8- %0.7 agar içeren temel besi ortamında başarılı bir şekilde kültüre almışlar. Agarın bu miktarı, sürgün uçlarının besi yeri ile sürekli temasının sağlanması için kritik öneme sahiptir. **Tabachnik ve Kester** tarafından kullanılan temel besi ortamı, %2 sakkaroz ve demir içeren KNOP besi ortamının makro ve mikro besin elementleri ile MS besi ortamının organik elementleri şeklinde modifiye olmuştur.

Tabachnik ve Kester (1977), kültüre alınan eksplantların gelişebilmesi ve canlılığını devam ettirebilmesi için, bir sitokinin gerekli olduğunu ileri sürmüşler. Proliferasyon ve çoğaltma aşamasında 1 mg/l BA' nın çok iyi sonuç verdiğini önermişler. Bu konsantrasyonda sürgün uzaması inhibe olurken, aksiller (yan) sürgün gelişimini teşvik ettiğini, buna karşın BA konsantrasyonunun 0.1 mg/l'ye düşürüldüğünde ise, sürgün uzamasının baskın olduğunu ve daha az aksiller sürgün proliferasyonunun oluştuğunu rapor etmişlerdir. Hibrit klonlar arasında gözlenen bu farklılıklar (sitokinine farklı cevap verme) **Tabachnik ve Kester'e (1977)** göre bitkilerin fizyolojik ihtiyaçlarının farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

Tabachnik ve Kester (1977) köklenme çalışmaları için yaptıkları deneylerde, sınırlı sonuçlar elde etmişlerdir. Karanlıkta, IBA içeren ortamda kültüre aldıkları 10 tüpten 5 tanesinde çok küçük kökçükler elde etmişler. İkinci bir deneyde, ışıktaki bırakılan 1 mg/l NAA içeren besi ortamında kültüre aldıkları 5 materyalden 2 tanesinde kök elde etmişler. Diğer bir deneyde ise, uzun sürgünleri kültüre almışlar ve oksin içermeyen ortamda kök gelişiminin çok zor olduğunu ve 10 tüpten bir tanesinde kök oluşturabilmişlerdir.

Nemeth (1979), ışıklı ortamda köklenmeyi başarmış. Şeftali X badem hibridinin sürgünlerini oksinsiz ortamda kültüre almış. Kök oluşumu aktivitesi sitokin bulunan (0.2 mg/l BA) ortamda meydana gelmiş. Kültüre alınan sürgünlerin %50'sinde ve her sürgünde 3 tane kök oluşmuştur. Ayrıca, oksinleri (IBA, NAA, NOA) kullanarak sürgünlerde kök oluşumunu hızlandırmıştır. Kültüre alınan sürgünlerin %71'inde ve her sürgünde 2 tane kök elde ederek 1 mg/l IBA'in en iyi sonucu verdiğini rapor etmiştir.

Hisajima (1982), bademin sürgün proliferasyonunu başarabilmiş ancak bunların köklenme oranı çok düşük olmuştur. Badem tohumlarını, 11 mg/l BA içeren modifiye MS besi ortamında yetiştirmiş ve bu kültürlerde oluşan sürgünleri çoğaltmak için, 0.2 mg/l BA ve 0.005 mg/ IBA içeren MS besi ortamının en iyi sonucu verdiğini tespit etmiştir.

Rugini ve Verma, (1983), badem çeliklerinin köklenmesi için yaptıkları denemelerde başarısız olmuşlar. **Kester ve Sartori, (1966)**, Badem X şeftali hibridi klonlarının köklenmesinin çok kolay olduğunu, bu nedenle bu hibridin anaç materyali olarak kullanılmasının uygun olduğunu bildirmişler. **Mc Comb (1982)**, Şeftali X badem

hibridlerini kullanarak bademin herbisitlere direnç kazanacağını öne sürmüştür. Ancak bu hibrit klonal materyal olarak çok az bulunur. Bu nedenle hem badem hemde badem X şeftali hibritlerinin doku kültürleri metodları ile çoğaltılması gereklidir.

Rugini ve Verma (1982, 1983) yaptıkları bir seri çalışma ile **Tabachnik ve Kester (1977)**'in yaptıkları çalışmadan biraz daha ileri gidebilmişler. *In vitro* şartlarda köklenmeye aldıkları sürgünlerin %55'nin köklendiğini rapor etmişler. 6 yaşındaki ferragnes kültür varyetesinin aktif haldeki tepe tomurcuklarını, 0.4-0.7 mm boyunda keserek kültüre almışlardır. Kültürden 20 gün sonra 0.5 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA içeren kültür başlatma besi ortamında tek bir sürgün geliştiğini bildirmişler. Sürgünlerin çoğaltılması 20 günde bir yapılan alt kültürler ile 6 kat arttığı rapor edilmiştir. Bademin bu çeşidi için proliferasyon ortamında düşük sitokin ve eser miktarda NAA'nın bulunmasının gerekli olduğunu tespit etmişlerdir.

BA oranı azaltılmış NAA bulunmayan benzer besi ortamında sürgünlerin uzaması sağlanmıştır. Sürgün uzama besi ortamında kültüre alındıktan 18-20 gün sonra sağlıklı iyi gelişmiş sürgünler, iki üç yaprak içerecek şekilde 12-20 mm boyunda kesilerek köklenme deneyinde kullanmışlardır. Köklenme, modifiye Bourgin ve Nitsch (1967) besi ortamında sürgünlerin 14 gün boyunca karanlıkta bırakılması sureti ile hızlanmıştır. Köklerin uzaması herhangi bir oksin ilavesi olmayan sıvı besi ortamında başarılı bir şekilde yapılmıştır.

Rugini ve Verma (1983), Mosella ve Morcheix (1979) tarafında şeftalinin köklenmesi için quercitrin, rutin, riboflavin kullanarak geliştirilen metodun bademde köklenmeyi teşvik etmediğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, bazı *citrus* ve *prunus* türlerinde köklenmeyi teşvik etmede **Button ve Bornmon (1971)** ile **Feucht ve Dausend (1976)** tarafından kullanılan GA3 ve ABA ilavesinin Ferragnes kültür varyetesinin köklenmesini engellediğini bildirmişlerdir.

Hartmann ve ark. (1990), bademin (*Prunus dulcis* Mill) *in vitro* şartlarda köklendirilmesinin oldukça zor olduğunu ve başarının sınırlı olduğunu elde edilen sonuçların tatminkar olmadığını rapor etmişlerdir.

Beyazoğlu ve Dural (1991), Konya çevresinde yayılış gösteren bazı *Amygdalus* L. (badem) türlerinin yağ miktarları ve yağ asitleri kompozisyonunu incelemişlerdir. İncelenen türler *Amygdalus communis* L., *A. Korshinskyi* (Hand-Mazz) Bornm., *A.X balansae* Boiss. ve *A. orientalis* Millerdir. Tohumlardaki yağ oranları solvent ekstraksiyon metodu ile tayin edilmiş ve yağ asitleri kompozisyonu gaz kromatografisiyle tayin edilmiştir. Türlerin yağ oranları %43,5-55,2 arasında bulunmuştur. Tohumlarda tayin edilmiş olan asitler, myristik, palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitlerdir.

Caboni ve Damiano (1994) İki farklı badem genotipi olan supernova ve M51'in çeliklerini *in vitro* ortamda kültüre alarak karanlığın (12 gün) ve oksinin (IAA, IBA) köklenmeye etkisi test edilmiştir. 2- 2,5 cm uzunluğunda aldıkları sürgünleri 10 µM IAA, 10 µM IBA +50 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ile katılaştırılmış Bourgin ve Nitsch'in besi ortamında kültüre alınmıştır. Sel.M51 kontrol de dahil olmak üzere, IAA ve IBA'in hem karanlık hem de ışıklı ortamında kök oluştururken Supernova çeşidinin sadece IBA'in karanlık ortamında kök oluşturduğunu bildirmişler. Araştırmacılar, çeliklerin köklenmesinde IAA ve IBA'in etkisinin badem genotipine göre değiştiğini rapor etmişlerdir.

Miguel ve ark. (1996), bademin Boa Casta çeşidinin genç ve yaşlı materyalinin *in vitro* kültürü sonucu oluşan yapraklarından adventif sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişler. Adventif sürgün oluşumunda MS besi ortamının, Quoirin ve ark. (1977)'nin modifiye ettiği besi ortamından daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Kültür başlatılmasında bitki büyüme düzenleyicisi olarak IBA, IAA ve TDZ'nin çeşitli konsantrasyonlarını kullanmışlar. TDZ yerine BA kullanıldığında, adventif sürgün oluşumunun görülmediğini rapor etmişler. Genç materyallerden alınan yaprak eksplantlarının rejenerasyon oranının (%40.0 - %38.2) yaşlı materyallerden alınan yaprak eksplantlarından daha yüksek olduğunu tespit etmişler. Yüksek sürgün oluşumu için TDZ'nin yüksek konsantrasyonların kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Sürgünlerin iki kez düşük BA konsantrasyonlarında (1.33 mµM) alt kültüre alınması ile yaşlı yaprakların rejenerasyonu %15'ten %35.3'e kadar yükseltebilmişlerdir. Bu sonuç test edilen tüm besi ortamları içinde Quoirin ve ark. (1977) önerdiği besi ortamında elde edilmiştir.

Gürel ve Gülşen (1998a), Texas ve Nonpareil badem çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* vejetatif çoğaltım olanaklarını araştırmışlardır. Bu amaçla farklı sakkaroz, agar ve pH düzeylerinin sürgün proliferasyonu, sürgün gelişmesi ve büyümesine etkisini incelemişlerdir. %5 ve 6 sakkaroz ile pH 5.5 te ilk dikim ve şaşırtma aşamasında en iyi eksplant gelişmesini sağladıklarını bildirmişlerdir. Düşük agar dozlarında sürgün verimi ve gelişiminin iyi olduğunu ancak bu dozlarda sürgünlerde camlaşma (vitrikasyon) meydana geldiğinden, bu aşama için %0.7 agarın en iyi doz olduğunu tespit etmişlerdir. Çoğaltma aşamasında ise en yüksek sürgün verimini %3 ve %4 sakkaroz, %0.7 agar ve pH 5.5 düzeylerinde elde edilmiştir. Araştırmacılar yüksek sakkaroz ve agar dozlarının, sürgünlerin dip kısımlarında kallus oluşumunu artırdığını belirlemişlerdir.

Gürel ve Gülşen (1998b), yaptıkları başka bir çalışmada yine sürgün ucu kültürü ile, farklı IBA ve BAP düzeylerini üç farklı kültür aşamasında (ilk dikim, şaşırtma ve çoğaltma) ayrı ayrı test ederek *in vitro* vejetatif çoğaltma olanaklarını araştırmışlardır. Sonuçta sürgün gelişmesi için hormon içermeyen veya sadece düşük düzeyde IBA (0.1 mg/l) içeren ortamların daha uygun olduğunu belirlemişler. Hem şaşırtma hem de çoğaltma aşamasında ise, 0.1 mg/l IBA ile 1.0 mg/l BAP kombinasyonunun sürgün verimi ve gelişmesi bakımından en iyi sonuçları verdiğini tespit etmişler. Genel olarak, sürgün oluşumu için her iki aşamada da BAP'ın gerekli olduğunu fakat yüksek düzeylerde (2.0 veya 3.0 mg/l BAP) kullanıldığında camlaşma (vitrifikasyon) ve sürgünlerde canlılığın azalmasına yol açan kallus oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Ainsley ve ark. (2000), bademin yaprak eksplantlarından itibaren sürgün oluşumunu kolaylaştıracak bir metod geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bu metod ile Nonpareil ve Ne Plus Ultra gibi yaygın ticari çeşitlerin *in vitro* koşullarda ürettikleri sürgünlerin yapraklarını kullanmışlar. İzole ettikleri yaprakları çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu Almehdi ve Parfitt (AP,1986)'in temel besi ortamında kültüre almışlar. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak 3 farklı oksini (2,4-D, NAA, IBA) iki farklı sitokin (BA, TDZ) ile kombine ederek ve kazein hidrolizatın çeşitli konsantrasyonlarını kullanarak adventif sürgün oluşumuna etkisini test etmişler. Sonuç olarak, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin genotipe göre değiştiğini ve Ne Plus Ultra eksplantlarından adventif sürgün oluşumuna NAA ve IBA'nın, oysa Nonpareil'de ise, sadece IBA'nın etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Sitokinler için ise, Ne Plus Ultra'da TDZ ve BA'nın sürgün gelişiminde etkili olmadığını, bununla birlikte Nonpareil'de kazein hidrolizat bulunmayan besi ortamında TDZ'nin etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Kazein hidrolizat ile birlikte 9.8 µM IBA ve 22.7-6.8 µM TDZ'nin bulunduğu bazal AP besi ortamında Ne Plus Ultra'da %44.4 Nonpareil'de ise %5.5 maksimum sürgün rejenerasyonunu sağlamışlardır.

Ainsley ve ark. (2001), 4 badem kültivarının (Ne Plus Ultra, Nonpareil, Carmel ve Parkinson) olgunlaşmamış kotiledonlarından itibaren sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. IBA ve TDZ (Thidiazuron)'nın farklı konsantrasyonlarının ve kültürün ilk 7 günü için ışığın bulunup bulunmamasının sürgün oluşumuna etkisini test etmişlerdir. Kotiledonlardan itibaren en yüksek sürgün rejenerasyonunu 10.0 µM TDZ içeren MS besi ortamında 8 hafta muhafaza edildikten sonra bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda 4 hafta bekletilmek suretiyle elde ettiklerini rapor etmişlerdir. 0.5 µM IBA'nın adventif sürgün gelişimini önemli ölçüde azalttığını

bildirmişler. Bu optimum koşullarda kotiledonlardan itibaren adventif sürgün oluşum oranı, Ne Plus Ultra'da %80, Nonpareil'de %73.3, Carmel'de %100 ve Parkinson'da %86.7 olduğu rapor edilmiştir.

Ainsley ve ark. (2001), Ne Plus Ultra ve Nonpareil badem çeşitlerinin sürgünlerini bitki büyüme düzenleyicisi olmayan düşük ışık yoğunluğunda alt kültüre almışlardır. Kök oluşturmada en uygun oksin çeşidi ve oranını tespit etmek için IBA ve NAA'yı kullanmışlardır. Her iki çeşitte de en iyi köklenme, sürgünlerin 1.0 mM IBA içeren %0.6 sıvı agarda 12 saat muamele edildikten sonra 100.0 µM PG (floroglucinol) içeren oksinsiz besi ortamında iki hafta bekletilmek suretiyle elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, eksplantları kültür başlatılması aşamasında 3 gün boyunca karanlık koşullarda muhafaza ettikten sonra ışığa maruz bırakmışlar ve bunun köklenme için etkili olmadığını tespit etmişler. Yarı yarıya seyreltilmiş MS'in Ne Plus Ultra sürgünlerinin köklenmesi için en uygun besi ortamı olduğunu ve tam güçteki AP besi ortamının ise Nonpareil'de en iyi köklenme sonucunu verdiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada bademin, yukarıdaki kayda değer literatür çalışmalarını göz önünde bulundurarak, GAP bölgesinin ağaçlandırılmasında ve ekonomik değerinin artmasında önem arz eden Nonpareil çeşidinin biyoteknolojik koşullarda klonlanması araştırmalarını amaç edindik.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada, materyal olarak *Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil badem çeşidinin olgun tohum ve farklı organları kullanıldı. Materyal, Şanlıurfa-Koruklu Tarımsal Araştırma istasyonundan temin edildi (Resim1,2).



Resim 1. Şanlıurfa-Koruklu Tarımsal Araştırma İstasyonunda bulunan *Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil üretim alanının görünüşü.

Bademin sistematikteki yeri aşağıda verildiği gibidir.

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Classis: Magnoliogside

Subclass: Rosidae

Ordo: Rosales

Familia: Rosaceae

Amygdalus communis L (Seçmen ve ark. 2000).



Resim 2. *Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil bitkisinde olgun meyvenin genel görünüşü.

Bademin kültür tarihi

Bademin anavatanı Orta ve Batı Asya'dır. Buradan doğuya doğru Çin ve Hindistan'a, batıya doğru Kuzey İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine yayılmış ve tamamen yerleşmiştir. Bununla birlikte Anadolu'da bodur acı badem (*Amygdalus nana*) zengin varyasyonlar göstererek yetişmekte olduğundan, memleketimizi bademin gen merkezlerinden biri olarak kabul edebiliriz. Bodur acı badem, Anadolu'nun kurak ve çıplak tepelerini örten çalılar arasında karakteristik bir meyve türü olarak göze çarpmaktadır.

Badem kültürü bundan dört bin yıl önce İran, Türkiye, Suriye ve Filistin'de başlamıştır. Yunanistan ve kuzey Afrika'ya ne zaman getirildiği kesin olarak bilinmemekle beraber, buralara muhtemelen prehistorik çağlarda gitmiştir. İtalya'da da çok eski çağlardan beri yetiştirilmiştir. Böylece badem ilk olarak Akdeniz çevresinde yerleşmiştir; badem, sonraları ilk kolonistler tarafından Kuzey Amerika'ya götürülmüş ve bu ülkede kültürü 1840'dan sonra özellikle Kaliforniya eyaletinde büyük bir gelişme kaydetmiştir.

Badem ağacı, kuzey yarı kürede 30 ile 44, güney yarı kürede ise 20 ile 40 enlem dereceleri arasında yayılmıştır. Bu bölgede yetiştiriciliği 600 ile 1000 metreye kadar çıkar,

daha yukarı enlem dereceleri ve yüksekliklerde ekonomik olarak yetiştirilmesi durur. Çünkü bu şartlar dışında ilkbahar geç donları ürüne zarar vereceği gibi sıcaklık toplamı da meyvelerin olgunlaşması için yetersizdir.

Kültür bademleri, *Amygdalus communis* L. türünden yüzyıllar boyunca yapılan seleksiyonlar sonucu meydana gelmiştir. Gerçekten, yetiştiriciler çok eskiden beri ekecekleri tohumları seçerken, yüksek kaliteli meyveler üzerinde titizlikle durmuşlar ve böylece yabaniliğe doğru fazla varyasyon göstermeden oldukça iyi, bir örnek özellikte meyve veren ağaçlar elde edebilmişlerdir. Bu durum, kültür badem tiplerinin kalıtsal yapılarında homozigotluğa doğru büyük bir gelişmeye sebep olmuştur. Bununla birlikte çekirdekten yetiştirilen badem ağaçlarında, alındığı kültür çeşidinin yüksek değerlerini her zaman ve emin olarak bulmak mümkün olmamakta ve bu yüzden kültür çeşitleri aşı ile üretilmektedir (**Özbek 1978**).

Türün önemi

Baharda pembe-beyaz çiçekler açan badem ağaçları, baharın müjdecisidirler. Yeşil renkteki meyvesi çağla halindeyken yenir. Olgunlaştıktan sonra sertleşen kabuğun içi yenir. Türkiye’de acı badem ve tatlı badem olarak çeşitleri vardır. Tedavide kullanılan kısmı meyvesidir. Tohumlarından elde edilen badem yağında, şekerler ve emülsin vardır. Eczacılıkta pomat hazırlamakta kullanılır. Bademin aşağıda verildiği gibi bir çok yararı vardır. Bunlar;

- Bedensel ve zihinsel yorgunluğu giderir.
- Sütle içildiğinde mideyi güçlendirir.
- Dıştan lapa ve merhem olarak kullanıldığında ağrı kesicidir.
- Böbrek, mesane ve idrar yolları iltihaplarına iyi gelir.
- Bronşit, boğaz ağrısı, anjin, baş ağrısı ve akciğer hastalıklarında faydalıdır.
- Kabızlığı giderir, müshil etkisi yapar.
- Toz haline getirilmiş badem, kozmetikte maske yapımında kullanılır.
- Acı badem tohumlarından su buharı distilasyonu ile elde edilen acı badem suyu

koku verici ve öksürük kesici olarak kullanılır.

Anadolu, bademin anavatanı olmasına rağmen, ülkemiz bu meyve türünün dış satımında önemli bir yere sahip olamamıştır. Ülkemizde bademe kıraç, susuz koşullarda ve bu tür alanları değerlendirmek amacıyla kullanılması gereken bir meyve gözüyle bakılmıştır. Badem için yapılan uğraşların büyük bir bölümü de kıraç arazi ağaçlandırılması şeklinde gerçekleşmiştir. Bu tür yetiştiricilikte bile ülkemiz, dünya badem

üretiminde ön sıralarda yer almıştır. Ancak büyük çoğunluğu tohumdan elde edilmiş veya standart olmayan çeşitlerle yapılan badem üretimi dış satımda önemli bir rol oynayamamış ve Türkiye badem satın alan bir ülke durumuna düşmüştür.

Ülkemizde endüstriyel anlamda badem yetiştiriciliği, ancak modern yöntemler ve standart bademler ile yapılırsa, dış alımı azaltacağı gibi dış satım olanağı da sağlayabilecektir. Türkiye’de badem ağaçlarına memleketimizin hemen hemen her yerinde rastlanmaktadır. Ekonomik anlamda yetiştiriciliği Çanakkale’den başlayarak bütün Ege bölgesine uzanmakta ve bu kıyıda içerilere doğru girerek Denizli’de de önemli bir üretim alanı bulunmaktadır. Akdeniz bölgesi ile Güney-Doğu Anadolu’da ve bu bölgenin İç Anadolu’ya geçit teşkil eden alanlarında badem yetiştiriciliği emniyetli olmakla beraber bir kısım yerlerinde ilkbahar geç donlarının zararlı etkileri sık sık görülmektedir. Bu nedenle geç çiçek açan çeşitleri tespit edilip yayılmalarını sağlamak büyük önem taşımaktadır.

Gerek memleketimizde ve gerek dünyanın badem yetiştiriciliğine uygun öteki bölgelerinde badem yetiştiriciliğini sınırlandıran faktör, kış soğuklarından çok, ilkbaharın geç donlarıdır. Çünkü bademler, mutedil iklim meyve türlerinin hepsinden önce çiçek açar ve ilkbaharın müjdecisidirler. Nonpareil en erkenci çeşitlerden iki hafta sonra, en geçi çeşitlerden 10 gün kadar önce çiçek açar. Böylece çiçeklenme mevsiminin ortasından geriye düşmekle, ilkbahar geç donlardan nispeten korunmuş olur. %60-70 gibi verim randımanı ile diğer badem çeşitleri içinde ticari değeri en iyi olanlardandır.

Bademin en önemli özelliği; taze meyvelere göre daha uzun süre saklanabilmesidir. Bu nedenle gelişmiş ülkelerde bir endüstri meyvesi olarak değerlendirilmektedir. Badem kabuklu veya iç badem olarak piyasaya sürüldüğü gibi turfanda çağla meyve olarak çok erken toplandığında da iyi gelir sağlamaktadır. Badem, sahip olduğu yüksek yağ oranı nedeniyle önemli bir enerji kaynağıdır. Bademin genel olarak içerdiği yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonları bilinmekte, ancak bunlar çeşit ve bu çeşitlerin yetiştirildiği ekolojilere göre değişim göstermektedirler.

Bademin pomolojik bakımından sınıflandırılması

Bademler, acı ve tatlı badem olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır.

Acı badem: Bu gruba giren bademlerin içleri çok miktarda siyanidrik asidi ihtiva ettiğinden acıdır. Asit siyanidrik insan için zehirli olduğundan bu bademlerin yenilmesi tehlikelidir. Ancak acı badem, yağı çıkarılmak için kullanılır. Endüstrinin çeşitli alanlarında çok eskiden beri faydalanılan bir ham maddedir.

Tatlı badem: Tatlı bademde acılığı veren asit siyanidrik ya hiç yok veya az miktarda bulunur. Tatlı bademler kabuk kalınlığına veya kabuğun kırılma durumuna göre dört gruba ayrılır:

El bademleri (kağıt kabuklu bademler): Bu gruptaki bademlerin, tohum sert kabuğu kağıt gibi ince olup iki parmak arasında sıkılınca kırılır. Genel olarak, iç verimlerinin yüksek oluşu (%70'e kadar) değerlerini artırır.

Diş bademleri (yumuşak kabuklu bademler): Bu bademlerde kabuk birinci gruptakilere göre biraz daha kalın olmakla beraber sert değildir. Bu nedenle dişle kolaylıkla kırılabilmektedir. Randımanları %50'ye varır.

Sert kabuklu bademler: Dişle çok zor kırılır. Randımanı %40'a kadar düşebilir.

Taş bademleri (çok sert kabuklu bademler): Kabukları çok kalın olduğundan iç randımanı düşüktür. Verim randımanı %18–30 kadardır.

Morfolojisi

Badem ağaçları, çalı veya 10 metreye kadar boylanabilmektedirler. Dikine ve yayvan büyürler.

Gövde, düzgün, odunsu, gri-parlak kırmızımtırak kahverengi olup lentiseller iridir.

Dallar; grimsi kahverengi, sık dalçıklıdır.

Gözler, yani meristemler odun ve meyve gözleri olarak gruplandırılırlar.

Yapraklar, uzun-ok biçiminde, parlak koyu yeşil renklidir.

Çiçekler, *Rosaceae* diyagramına göre; beş çanak, beş taç yaprağı, yirmi erkek organı ve bir dişi organı ihtiva eder. Taç yaprakları pembe-kırmızı renkte olup üzerleri koyu yeşil damarlıdır. Badem çiçeğinde, yumurtalık içerisinde iki tane tohum taslağı bulunur. Genellikle bunlardan yalnız birisi geliştiğinden, çekirdeğin içinde bir tane badem bulunur. Bazı çeşitlerde ise, iki tohum taslağının gelişmesi sonucu ikiz badem meydana gelir. Bunların ticari değeri yoktur.

Meyve, Badem meyvesi, şeftali ve kayısı gibi bir sert çekirdekli meyvedir. Ancak, olgun bademin içi yendiğinden sert kabuklu meyveler grubunda da yer almaktadır.

Bununla birlikte, bademde meyveler henüz küçük iken, yani etli kısım kurumadan ve sert kabuğu teşkil eden endokarp tozlaşmadan önce çağla olarak yenilmesi mümkündür. Meyveler, kabuğu yeşil ve üzeri keçe tüylü, etli kısmı susuz ve kurudur.

Döllenme biyolojisi

Bademlerde, kromozom sayısı $n=8$ dir ve tozlanma arılarla olur. Bademler, genellikle birkaç çeşit dışında kendiyile uyuşmaz ve ayrıca, çeşitler arasında karşılıklı uyuşmazlık durumu da görülebilir. Bu nedenle badem plantasyonları en az iki çeşitle kurulmalıdır.

Ekolojik istekleri

Badem ağacı, başka meyve ağaçlarının iyi yetişemeyeceği kurak, taşlı, çakıllı ve kireçli topraklarda çok iyi büyür. Toprak bakımından seçici değil ancak kumlu-tınlı topraklarda en iyi sonucu verir. GAP Bölgesinin toprak yapısı da badem yetiştiriciliğine çok uygundur. Badem, topraktaki aşırı nemden ve taban suyunun oynaklığından hoşlanmaz. Besin elementleri noksanlığı bulunan topraklarda ağaçlar iyi gelişemez ve meyve tutumu düşük olur. Bu nedenle kumlu, çakıllı, kuru topraklar organik maddelerce desteklenmelidir. Badem kış soğuklarına dayanıklı bir bitkidir. Toros dağlarında 1050 m yüksekliklerde dahi zarar görmeden yetişir. Ancak badem yetiştiriciliğini sınırlayan en önemli faktör ilkbaharın geç donlarıdır. Çünkü badem, birkaç ılıman iklim meyve türlerinden önce çiçek açar. Bu nedenle, ilkbahar geç donlarının sürekli görüldüğü yerlerde bademden kararlı ürün elde etmek mümkün değildir. Badem ağaçları, meyve çeşitleri içerisinde kurağa en çok dayanan türlerin başında gelir. Yaz aylarında yeterli sıcaklığın olmadığı yerlerde ekonomik bir yetiştiricilik yapılamaz. Akdeniz ve Ege bölgesinde zeytin ve incirin Orta Anadolu'da ahlatın, Güneydoğu Anadolu'da antepfıstığı ile meydana getirdiği kombinasyonlar buna en güzel örnektir.

Badem bahçelerinde yapılacak düzenli sulamalar meyve verim ve kalitesini arttırarak, dış kabuğun kavlaması üzerine olumlu etki yapacaktır. Ancak toplanmadan hemen önce yapılacak sulamalardan kaçınmak gerekir. Özellikle GAP Bölgesinde elde edilen güzel sonuçlardan biri de bademler sulandığı zaman, meyvelerde kavlama olayının yaklaşık %80 dolayında ağaç üzerinde gerçekleşmiş olmasıdır.

Bahçe tesisi ve yıllık bakım işleri

Kıraç yerlerde badem tohumları doğrudan yerlerine ekilip, yerinde aşılanabileceği gibi, sulanabilen koşullarda aşılı fidanlarla ilkbahar veya sonbaharda dikim yapılabilir.

Bademlerde kendi ile ve karşılıklı uyumsuzluk görüldüğünden badem bahçeleri en az iki çeşitle kurulur. Bahçe, ekonomik önemi olan çeşitten iki sıra, tozlayıcı çeşitten bir sıra şeklinde kurulabildiği gibi ekonomik önemi olan ve biribiri ile uyuşan iki çeşit ile ikişer sıra şeklinde de dikilebilir. Dikim aralıkları çeşitlere, ekolojik koşullara ve uygulanacak bakım koşullarına bağlı olarak değişir. Bu aralıklar, 3x3 m, 3x6 m, 5x6 m veya 6x6 m olabilir. Özellikle azotlu gübrelerin büyüme ve verim bakımından etkili oldukları görülmüştür. Dekara 10-25 kilogram saf azot yeterlidir.

Badem ağaçları genellikle çok fazla budama istemez, ancak düzenli bir şekilde kuruyan, biribiri içerisine giren dalların alınması ve ağaç tacının ışığın girmesine olanak sağlayacak şekilde aralanması yararlı olacaktır. Dikim sırasında ağaçlara doruk dallı şekil verilmelidir. 3.yılından itibaren yıllık sürgünler 40-50 cm'den kısaltılmalı, sık dallar testere ile çıkarılmalıdır. Ağaçlar yaşlanınca 15-20 yıl sonra gençleştirme budaması yapılması da yerinde olacaktır.

Badem ağaçlarının çoğaltılması ve ıslahında kullanılan geleneksel yöntemler

Aşı ile çoğaltılması: GAP Bölgesinde yaz aylarında sıcaklık çok yüksek (40–50°C) olduğu için aşılama, diğer bölgelerde olduğu gibi, Temmuz-Ağustos ayları yerine, sıcaklıkların nispeten azaldığı Eylül ayında yapılmalıdır. Eylül ayı sonunda anaçlarda kabuğun iyi kalkmaması nedeni ile 'T' göz aşısının yapılma güçlükleri ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle aşılama için, kabuğun kalkmasını gerektirmeyen yonca göz aşısı tercih edilmelidir. Badem yetiştiriciliğinde toprak kadar kullanılan anacın da önemi büyüktür. Bademe anaç olarak şeftali, erik, badem ve zerdali kullanılabilir. Anaç seçiminde çeşitlerle uyuşma, toprak koşulları, su durumu, toprağın kök kanseri ve nematodla bulaşık olup olmaması rol oynar.

Badem anacı: Bademin en uygun anacı, badem tohumundan yetiştirilmiş fidandır. Badem çöğürleri tatlı veya acı yabani ve kültür çeşitlerinin tohumlarından elde edilir. Badem anacının çeşitlerle uyuşması çok iyidir. Ancak badem anacı kök kanseri ve nematodlara karşı duyarlıdır.

Hibrit anacı: Badem X şeftali melezi olan GF677, badem için en uygun anaçların başında gelir. Ağacı kuvvetli büyütür, erken meyveye yatırır ve bol verimli ağaçlar oluşturur.

Şeftali çöğürü: Bu anaç çeşidi ancak yağışların uygun olduğu veya sulanan yerlerdeki aluviyal veya kumlu-tınlı topraklarda uygun olur. Çoğunlukla şeftali anacı bademin

uyuşması iyi değildir ve aşu noktası üzerinde şişkinlik olur. Şeftalinin hayatta kalma süresi 8–10 yıllla sınırlı olduğu için, ekonomik değildir.

Erik anaçları: Erik, drenaj koşullarının iyi olmadığı ağırca topraklarda bademe anaç olarak kullanılabilir. Genellikle, erikler badem ile iyi uyuşmaz verim düşük kalır, meyvelerin büyük bir kısmında dış kabuğun bademe yapışık kaldığı görülür ve ağaçlar kısa ömürlü olur. Ancak bazı erikler nematoda dayanıklıdır.

Zerdali anaç: Zerdali, bademin yetiştiği yerlere uygun topraklarda yetişir ve nematodlara dayanıklıdır. Bu anaç üzerinde bademler, önce iyi büyürse de sonradan kalem ile anaç arasında uyuşmazlık problemi ortaya çıkabilir.

Çeliklerle çoğaltma: Çelikle çoğaltma vejetatif çoğaltmanın diğeri bir yöntemini oluşturur. Çelik, herhangi bir bitkiden kesilen köksüz dal, yaprak, göz, gövde ve kök parçalarına denir. Bunların uygun çevre koşullarında köklendirilerek, yeni bitkilerin elde edilmesi işlemine de çelikle çoğaltma adı verilir. Bu çoğaltma şekli, aşu ile yapılan çoğaltmaya göre daha hızlı, basit ve ucuzdur. Alındıkları zamana göre çelikler yeşil, odunsu ve odun olmak üzere üçe ayrılır. Odun çelikleri, bitkiler kış dinlenme dönemine girdikten bir süre sonra ve ilkbahar gelişme dönemi başlamadan önce hazırlanabilir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Eksplant Şekilleri

Yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılacağı gibi Nonpareil badem çeşidi geç çiçek açtığı, uzun yıllar yaşadığı, yüksek verim arz ettiği ve ülkemizin jeolojik, jeomorfolojik ve meteorolojik koşullarına en uygun bir bitki olduğu için araştırma materyalimiz olmuştur. Biyoteknolojik çalışmalarımıza, aşağıda belirttiğimiz badem eksplantları ile başladık.

-Olgun tohum: Materyal olarak Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından izole edilen zigotik embriyolar kullanıldı (Resim:3,4).

<u>Kabuklu badem:</u>	<u>İç badem</u>
2.1 g	1.4 g ağırlığında
33 mm	25 mm uzunluğunda
19 mm	13 mm eni
12 mm	8 mm kalınlığında

Bir çeşit el bademi olan Nonpareil'in, randımanı %65–70 olup, çift oranı %20–25 arasındadır.



Resim 3. Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumu



Resim 4. Olgun tohumdan izole edilen zigotik embriyolarının MS besi ortamına ilk ekimi. X 1.559

-Lateral tomurcuk: Yaşlı ağaçlardan (18 yıllık) alınan lateral tomurcuklar kullanıldı. Uyku halinde ve açılmak üzere olan tomurcuklar olmak üzere iki şekilde alındı.

-Sürgün uçları: Yaşlı ağaçlardan (18 yıllık) alınan apikal sürgün uçları materyal olarak kullanıldı.

-Çiçek tomurcukları: Çiçek tomurcukları, çiçeklenme döneminden bir hafta önce (tozlaşmadan önce) alınarak kallus oluşturma amacı ile kullanıldı.

3.2. Metod

Bu çalışmada **Gautheret (1959)** ve **Başaran (1990)** tarafından izlenen ve önerilen teknikler esas alınarak yürütülmüştür. Buna göre yapılan işlemleri şöyle sıralayabiliriz.

3.2.1. Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pamuklar 2 kat ambalaj kâğıdına sarılıp, etüvde 180°C'de iki saat süreyle sterilizasyona tabi tutuldu. Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bistürilerin muhafazası ve bitki parçalarının kesilmesi amacı ile iki ayrı ebatta kullanılan filtre kağıtları, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

3.2.2. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler (tüp, petri kutusu, erlen, mezür, balon joje, pipet, beher) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile iyice temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde bir saat bekletilmek suretiyle kurutuldu. Tamamen kurumuş olan tüplerin ağzı steril pamuklar ile kapatıldı. Daha sonra ambalaj kağıtları ile iki kat sarılıp etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

Kullanılan magenda GA-7 kültür kapları ise alüminyum folyo ile sarılarak 121°C'de ve 1 atmosfer basınçta 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi.

3.2.3. Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pens ve bistüriler, önce %96'lık etil alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 300°C'lik bir kuru sterilizatörde 30 dakika süre ile sterilize edildi.

3.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda besi ortamı olarak **Murashige ve Skoog (1962)** tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması, aşağıda belirtilmiştir:

MS (makro elementler) ana solüsyonu

NH_4NO_3	16.5 g
KNO_3	19.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
KH_2PO_4	1.7 g
Distile Su	1000 cc.'ye tamamlanır.

MS mikro 1 elementler ana solüsyonu

H_3BO_3	620 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg
KI	83 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

MS mikro 2 elementler ana solüsyonu

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Kompleks kelatör ana solüsyonu

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78 g
Na_2EDTA	2.00 g
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

Vitamin karışımı ana solüsyonu

Nikotinic asit	50 mg
Glisin	2.00 mg

Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

B₁ vitamini ana solüsyonu

Tiamin HCl	100 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

BAP (6-Benzylaminopurin) ana solüsyonu

BAP	100 mg
1N HCl	2-3 ml
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

NAA (α Naftalenasetik asit) ana solüsyonu

NAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 ml
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

IAA (İndolasetikasit) ana solüsyonu

IAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	5-10 ml
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

IBA (3-İndolbutirik asit) ana solüsyonu

IBA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 ml
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) ana solüsyonu

2,4-D	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	100 cc'ye tamamlanır.

Kinetin ana solüsyonu

Kinetin	100 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Bu bileşimlerden hazırlanan MS kültür besi ortamı aşağıda belirtilen biçimde düzenlendi.

Agar	7 g
Sakkaroz	30 g
MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc
Komplex kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
B ₁ vitamini ana solüsyonu	1 cc
Distile su	1000 cc.'ye tamamlandı.

Besi ortamlarının sterilizasyonu, 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda bekletilmek sureti ile yapıldı. Sterilizasyonu yapılan besi ortamı, steril kabin içerisinde magenda GA-7 kültür kaplarına bölüştürüldü (50-60 cc).

3.2.5. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Röpikaj odasında, bir ultraviyole lambası, içinde ekim işlemlerinin gerçekleştirildiği steril bir kabin ve kabin içerisinde bunzen beki bulunmaktadır. Röpikaj odasına girilmeden 24 saat önce, kapı, duvar, masa, dolaplar, taban vs. seyreltilmiş sodyum hipoklorit (%53 NaOCl) veya kalsiyum hipoklorit (CaOCl) ile steril edildi. Steril kabinin iç ve dış yüzeyi alkol (%70) ile temizlendi. Oda temizlendikten sonra, ultraviyole lambası ekim işlemlerinden bir gece önce 2-4 saat açık bırakılarak sterilizasyon tamamlandı.

Kültür odasında, 3000-5000 lüks'lük ışık şiddetine sahip floresans ampulleri ve ortam sıcaklığının 25±2 °C'de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Kültür odası bir zaman ayarlayıcı yardımı ile 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak biçimde fotoperiyoda ayarlandı.

3.2.6. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu

Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından itibaren organogenesis çalışmaları için sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gerektiği düşünülerek aşağıdaki sterilizasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.6.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Olgun Tohumlarının Çimlenmesi ve Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'in Etkisi

Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından itibaren organogenesis çalışmaları için sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi amacı ile NaOCl'in etkisi araştırıldı. Bu deneyde, tohumların aksenik çimlenmesi ve dekontaminasyonuna etkisini tespit etmek için NaOCl (%53)'in %3 - %5 - %10 - %15 'lik konsantrasyonları bir kontrol grubu ile birlikte test edildi. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu aşağıdaki gibi yapıldı.

Sert kabukları çıkarılmış tohumlar, musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik alkolde 30 sn çalkalanarak ön sterilizasyonu yapıldı. Daha sonra tohumları, NaOCl'in %3 - %5 - %10 - %15'lik çözeltileri içerisine 30 dakika süre ile bırakıldı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanmak üzere NaOCl'den arındırıldı. Sonra steril kurutma kağıtları üzerinde pens ve bistüri yardımı ile zigotik embriyolar izole edilerek MS besi ortamı içeren magenda GA-7 kültür kaplarında kültüre alındı.

Tohumların çimlenmesi ve gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce, KOH ile, 5.7-5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Kültürün 14. gününde enfekte olan ve çimlenen tohumların sayısı yüzde olarak tespit edildi. Elde edilen veriler **Tablo.1**'de verilmektedir.

Tablo.1. Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl' in etkisi.

İşlemler	Enfekte olan Tohum (%)	Çimlenen Tohum(%)
%3 NaOCl 30 dakika	60	30
%5 NaOCl 30 dakika	50	20
%10 NaOCl 30 dakika	10	60
%15 NaOCl 30 dakika	10	50
Kontrol	100	20

Rakamlar kültürün 14. gününde her konsantrasyon için toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Kontrol grubundaki zigotik embriyolar 3. günden itibaren enfekte olmaya başladı ve 7 gün içerisinde materyallerin hepsinde enfekte tespit edildi. **Tablo.1.** de görüldüğü gibi, sterilantın konsantrasyon oranı yükseldikçe enfeksiyon oranı düşmektedir. Çimlenme, kontrol grubu dahil olmak üzere bütün serilerde görüldü. Enfeksiyonun en az ve çimlenmenin en fazla olduğu oran %10 NaOCl olarak belirlendi.

Morfolojik gözlemler, eksplantların kültüre alınmasından 3 gün sonra, zigotik embriyoların radikula kısmında hacim artışı (şişme) olduğu görüldü. Kültüre alındıktan 5 gün sonra çimlenmenin başlaması ile birlikte, gövde ve sekonder yaprakların oluşumu 10 günlük kültür dönemi sonrası oldukça belirginleşti. 14. günde, çimlenen fidelerin gövde uzunluğu 0.5- 1.0 cm arasında ve büyük yapraklı olduğu görüldü.

3.2.6.2. Bademin Ürün Veren Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Yüze Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Deneyde sürgün uçlarının yüze sterilizasyonuna %5-%10 ve %15'lik NaOCl çözeltilerinin etkisi ayrı ayrı test edildi. Materyal, 1-1.5 cm uzunluğunda kesilip musluk suyunda 3-5 dakika yıkanarak %70'lik alkolde 30 saniye çalkalandı. Ön sterilizasyonu yapılan materyaller NaOCl'in yukarıda belirtilen konsantrasyonlarında 30 dakika süre ile bekletilerek yüze sterilizasyonu tamamlandı. Daha sonra steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak NaOCl'den arındırıldılar. Steril kurutma kağıtları arasında pens ve bistüri yardımı ile materyallerin NaOCl'den zarar görmüş kısımları kesilerek magenda GA-7 kültür kaplarına ekimi yapıldı. Sürgün uçlarının gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı 7 g/l agar 30 g/l sakkaroz ve 1 mg l⁻¹ BAP ile desteklendi. Sonuçlar aşağıda **Tablo.2'**de verilmektedir.

Tablo.2. Nonpareil badem çeşidinin ürün veren ağaçlarından alınan sürgün uçlarının yüze sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi

İşlemler	Enfekte olan kültür %'si	Yaşayan kültür %'si
Kontrol	100	0
%5 NaOCl	80	20
%10 NaOCl	40	60
%15 NaOCl	20	0

Rakamlar kültürün 14.gününde NaOCl'in her konsantrasyonu için 10 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Tablo.2'deki sonuçlardan anlaşılacağı gibi, kontrol grubunun tamamının ilk 3-5 gün içerisinde enfekte olması nedeni ile mutlak suretle yüzey sterilizasyonunun gerekli olduğu tespit edildi. Materyalin sterilizasyonu için kullanılan %5'lik NaOCl'in, yeterli olmadığı kültürde %80 oranında enfekte görülmesi ile belirlendi. %15 NaOCl'te ise, her ne kadar enfeksiyon oranı düşük görülsede 2. günden itibaren dokuların kararması ve canlılığını yitirmesinden materyalin sterilizasyonu için bu oranın fazla geldiği tespit edildi.

Ürün veren badem ağaçlarından alınan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için %10 NaOCl'in optimum oran olduğu saptandı.

3.2.6.3. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl İçinde Optimum Bekletilme Süresinin Araştırılması

Bir önceki deneyde sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için NaOCl'in %10'luk konsantrasyonunun uygun olduğu belirlendi. Bu doğrultuda optimum bekletme süresini tespit etmek için sürgün uçları, %10'luk NaOCl çözeltisi içinde 35-40-45-50 dakika süre ile bekletildi. Materyallerin hazırlanışı ve kültüre alınışı bir önceki deneyde olduğu gibi yapıldı. Deney sonucunda elde edilen veriler aşağıda **Tablo.3.'de** verildiği gibidir.

Tablo.3. Ürün veren badem ağaçlarından alınan sürgün uçlarının dekontaminasyonu üzerine NaOCl içinde optimum bekletilme süresinin tespiti

İşlemler	Enfekte olan kültür %'si	Yaşayan kültür %'si
%10 NaOCl-35 dakika	64	36
%10 NaOCl-40 dakika	36	64
%10 NaOCl-45 dakika	27	73
%10 NaOCl-50 dakika	27	73

Rakamlar kültürün 14.gününde her işlem için 11 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Tablo.3. de alınan sonuçlara göre, *in vitro* şartlarda kültüre alınan sürgün uçlarının sterilizasyonu için %10'luk NaOCl'de 45-50 dakika bekletilerek yapılabileceğini göstermektedir. İmmersiyon süresinin 30 dakikadan 45 dakikaya uzatılması enfekte olmayan kültür sayısında önemli derecede azalmaya neden oldu. Böylece alınan veriler ışığında, sürgün uçlarının *in vitro* kültüründe %10'luk NaOCl içinde 45 veya 50 dakikalık bir işlem kombinasyonu ile sterilize edilebileceği tespit edildi.

3.2.6.4. Bademin Ürün Veren Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Çalışmada, yaşlı ağaçlardan alınan lateral tomurcukların sterilizasyonu için bir sterilant olan NaOCl'in etkisi araştırıldı. Lateral tomurcukların büyümesi ve dekontaminasyonuna etkisini saptamak için NaOCl'in %3 - %5 - %10 ve %15 olan konsantrasyonları bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

1.5-2.0 cm uzunluğunda ve 2-3 tane tomurcuk içerecek şekilde kesilen materyaller musluk suyunda 3-5 dakika yıkanıp %70'lik alkolde 30 saniye çalkalanarak ön sterilizasyonu yapıldı. Materyaller, yukarıda belirtilen NaOCl çözeltileri içerisinde 30 dakika süre ile bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlandı. Her seri steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak steril kurutma kağıtları üzerinde steril pens ve bistüri yardımı ile lateral tomurcuklar gövdeden ayrıldı. Tomurcukların koruyucu örtü tabakası soyularak magenda GA-7 kültür kaplarına ekimi yapıldı.

Tomurcukların büyümesi ve gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı 40 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 1 mg l⁻¹ BAP ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Tomurcukların büyümesi morfolojik olarak gözlenerek rapor edildi. Deney sonucunda elde edilen veriler **Tablo.4.** de verilmektedir.

Tablo.4. Bademin ürün veren ağaçlarından alınan lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi

İşlemler	Enfekte olan kültür %'si	Gelişen kültür %'si
Kontrol	100	0
%3 NaOCl-30 dakika	100	0
%5 NaOCl-30 dakika	50	50
%10 NaOCl-30 dakika	10	90
%15 NaOCl-30 dakika	10	70

Rakamlar kültürün 14.gününde her işlem için 10 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Tablo.4. deki verilerden anlaşılacağı gibi kontrol grubunun tamamının ilk 3 gün içerisinde enfekte olması ile lateral tomurcukların mutlak suretle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması gerekliliği saptandı. Yüzey sterilizasyonu için kültüre alınan materyallerin %50'sinde enfekte görülmesi nedeni ile %3 ve %5 NaOCl konsantrasyonlarının yeterli

oran olmadığı tespit edildi. %15 NaOCl oranı ise, her ne kadar sterilizasyon için yeterli olsa da gelişen kültür yüzdesinin oranını düşürdüğü için terk edildi.

Tablo.4'de alınan verilere göre, ürün veren badem ağaçlarından alınan lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonu için, %10 NaOCl'de 30 dakika bekletmenin uygun olduğu tespit edildi.

3.2.6.5. Nonpareil Badem Çeşidinde Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu

Çiçek tomurcukları, musluk suyunda 3-5 dakika yıkılarak %70'lik alkolde 30 saniye çalkalandı. Ön sterilizasyonu yapılan materyaller, %5'lik NaOCl içerisinde 20 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlandı. Daha sonra çiçek tomurcukları steril saf su içerisinde 5 kez 5'er dakika olmak üzere çalkanarak NaOCl'ten arındırılarak sterilizasyon işlemleri tamamlandı.

3.2.7. Ekim İşlemleri

3.2.7.1. Bademin (*Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil) Olgun Tohumlarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları

3.2.7.1.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Zigotik Embriolarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmalarında Sitokinlerin Etkisi

Nonpareil badem çeşidinin tohumlarından itibaren mikroçoğaltma çalışmalarında, materyal olarak zigotik embriolar kullanıldı. Olgun tohumlardan izole edilen zigotik embrioların mikroçoğaltma kapasitesine, sitokinlerin (BAP, kinetin) etkisi araştırıldı. Bu amaçla, aşağıda verilen sitokin konsantrasyonları bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

-0.5 - 1.0 – 2.0 – 4.0 mg l⁻¹ BAP

-0.5 - 1.0 – 2.0 – 4.0 mg l⁻¹ kinetin

-Kontrol (hormon içermeyen MS)

Sert kabukları çıkarılmış tohumlar, musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik alkolde 30 sn çalkalanarak ön sterilizasyona tabi tutuldu. Materyalin sterilizasyonu, **Bölüm 3.2.6.1** de rapor edildiği gibi, %10 NaOCl içerisinde 30 dakika bekletilerek yapıldı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanmak suretiyle NaOCl'den arındırıldı. Daha sonra steril kurutma kağıtları üzerinde pens ve

bistüri yardımı ile zigotik embriyolar izole edilerek, yukarıdaki sitokinin konsantrasyonları ilave edilmiş MS besi ortamı bulunan magenda GA-7 kültür kaplarına ekimi yapıldı. Zigotik embriyoların büyümesi ve gelişmesi için MS besi ortamı, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ilavesi ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Embriyoların büyümesi ve gelişmesinde sitokinlerin (BAP, kinetin) etkisi, kültüre alındıktan sonra morfolojik olarak gözlemlendi. 4 haftalık kültür dönemi sonrası oluşan sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayısı ve köklenme oranı yüzde olarak tespit edildi.

3.2.7.1.2. *in vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin proliferasyonuna BAP oranlarının etkisi araştırıldı. Sürgün proliferasyonuna BAP'ın etkisini tespit etmek için MS besi ortamına, aşağıda verilen hormon miktarları ilave edilerek bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

- 0.1 mg l⁻¹ BAP
- 0.5 mg l⁻¹ BAP
- 1.0 mg l⁻¹ BAP
- 2.0 mg l⁻¹ BAP

Bu amaçla, tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lık alkolde 30 sn çalkalanarak ön sterilizasyona tabi tutuldu. Tohumların yüzey sterilizasyonu %10 NaOCl içerisinde 30 dakika bekletilerek yapıldı. Daha sonra, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanmak üzere NaOCl'den arındırıldı.

Steril kurutma kağıtları üzerinde pens ve bistüri yardımı ile zigotik embriyolar izole edilerek, hormon içermeyen MS besi ortamına ekimi yapıldı. Zigotik embriyoların büyümesi ve gelişmesi için MS besi ortamı, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ilavesi ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Kültüre alındıktan 2 hafta sonra, hormonsuz MS besi ortamında gelişen sürgünler 1.5-2.0 cm boyunda, 1-2 nod içeren ancak yapraksız bir şekilde kesilerek, 0.1 - 0.5 - 1.0 - 2.0 mg l⁻¹ BAP konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alındı.

3.2.7.1.3. *İn vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Oksin Çeşidi ve Oksin Oranlarının Etkisi

İn vitro şartlarda elde edilen Nonperil badem sürgünlerinin proliferasyonuna oksinlerin etkisini saptamak amacı ile 1.0 mg l⁻¹ BAP sabit tutularak IAA ve NAA'ın farklı konsantrasyonları test edildi. Bu amaçla, zigotik embriyolardan itibaren hormonsuz MS besi ortamında *in vitro* şartlarda 2 hafta boyunca yetiştirilen sürgünler, steril kabin içerisinde steril filtre kağıtları arasında pens ve bistüri yardımı ile 0.5-1.0 cm uzunluğunda, 1 nod içerecek şekilde kesilerek, aşağıda belirtilen oksin oranlarının bulunduğu ve 1.0 mg l⁻¹ BAP ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alındı.

-1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.1 mg l⁻¹ IAA

- 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.1 mg l⁻¹ NAA

-1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ IAA

- 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA

-1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA

- 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ NAA

3.2.7.1.4. *İn vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna MS Miktarlarının Etkisi

Bademin zigotik embriyolarından *in vitro* şartlarda elde edilen sürgünlerin proliferasyonuna MS besi ortamının etkisi araştırıldı. Bu amaçla besi ortamına, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 1.0 mg l⁻¹ BAP ilave edilerek, aşağıda belirtilen MS oranları hazırlandı.

-1/4 MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP

-1/2 MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP

-1/1 MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP

-2/1 MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP

İn vitro koşullarda embriyolardan itibaren gelişen Nonpareil badem sürgünleri, steril kabin içerisinde, bunzen beki alevi önünde steril pens ve bistüri yardımı ile steril filtre kağıtları arasına alınarak jelozundan arındırıldı. Sonra sürgünler 1,5-2 cm uzunluğunda ve 5-8 yaprak içerecek şekilde kesilerek, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan besi ortamının bulunduğu magenda GA-7 kültür kaplarına ekimi yapıldı.

3.2.7.1.5. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Şeker çeşidinin Etkisi

Nonperil badem sürgünlerinin proliferasyonuna etkisini test etmek için 3 farklı şeker çeşidi kullanıldı. 1/1 MS + 7 g/l agar ile desteklenen besi ortamına aşağıda belirtilen şeker miktarları ilave edildi.

-30 g/l sakkaroz

-30 g/l maltoz

-30 g/l dekstroz

Steril kabin içerisinde ve steril filtre kağıtları arasında 1.5 – 2 cm uzunluğunda ve 5-10 yaprak içerecek şekilde kesilen sürgünler, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan besi ortamında kültüre alındı. Test edilen her oran için altı adet materyal kullanıldı.

3.2.7.1.6. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Materyal Şeklinin Etkisi

Zigotik embriyolardan elde edilen Nonpareil badem sürgünlerinin mikroçoğaltma çalışmalarında, kültüre alınan materyal şeklinin etkisi araştırıldı.

Bu amaçla, kültüre alındıktan 2 hafta sonra zigotik embriyolardan gelişen sürgünler, steril kabin içerisinde pens ve bistüri yardımı ile filtre kağıtları arasına alınarak jelozundan arındırıldı. Daha sonra sürgünlerin bir kısmı, bir nod, diğer bir kısmı ise nod içermeyecek şekilde yapraklarından temizlenerek 0.4-0.5 cm uzunluğunda kesildi ve 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kültüre alındı.

3.2.7.1.7. Zigotik Embriyolardan *in vitro* Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Mikroçoğaltılması

Mikroçoğaltma çalışmalarında, başlangıç materyali olarak Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından izole edilen zigotik embriyolar kullanıldı. Kültürün başlatılması için badem tohumlarına, materyalin sterilizasyonu bölümünde anlatıldığı gibi, yüzey sterilizasyonu uygulandı.

Mikroçoğaltma çalışmaları için MS besi ortamına 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 0.5 –1.0 mg l⁻¹ BAP ilave edildi. Besi ortamının pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8'e ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

İlk ekim sonunda gelişen sürgünleri çoğaltmak amacı ile yukarıda belirtilen 0.0-0.5-1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamına dört haftalık aralıklarla alt kültüre alındı.

3.2.7.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından İtibaren Organogenesis Çalışmaları

3.2.7.2.1. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının *in vitro* Koşullarda Mikroçoğaltılması

Ürün veren Nonpareil badem ağaçlarından (18 yaşında) alınan sürgün uçları, mikroçoğaltma çalışmalarında materyal olarak kullanıldı. Materyalin sterilizasyonu, **Bölüm 3.2.6.2** ve **3.2.6.3.** de anlatıldığı gibi, %10 NaOCl içerisinde 45 dakika bekletilmek suretiyle yapıldı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan sürgün uçları, 5 kez 5'er dakika steril saf suda çalkalanarak NaOCl'den arındırıldı. Daha sonra steril kabin içerisinde steril filtre kağıtları arasında kurutuldu. Steril kurutma kağıtları arasında pens ve bistüri yardımı ile NaOCl'den zarar görmüş olabilecek kısımları kesilerek magenda GA-7 kültür kaplarına sürgün uçlarının ekimi yapıldı.

Sürgün uçlarının gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı 7 g/l agar 30 g/l sakkaroz ve 0.5 - 1.0 mg l⁻¹ BAP ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Sürgün uçlarından itibaren mikroçoğaltma çalışmaları, dört haftada bir yapılan alt kültür işlemleri ile yaklaşık sekiz ay boyunca devam ettirildi.

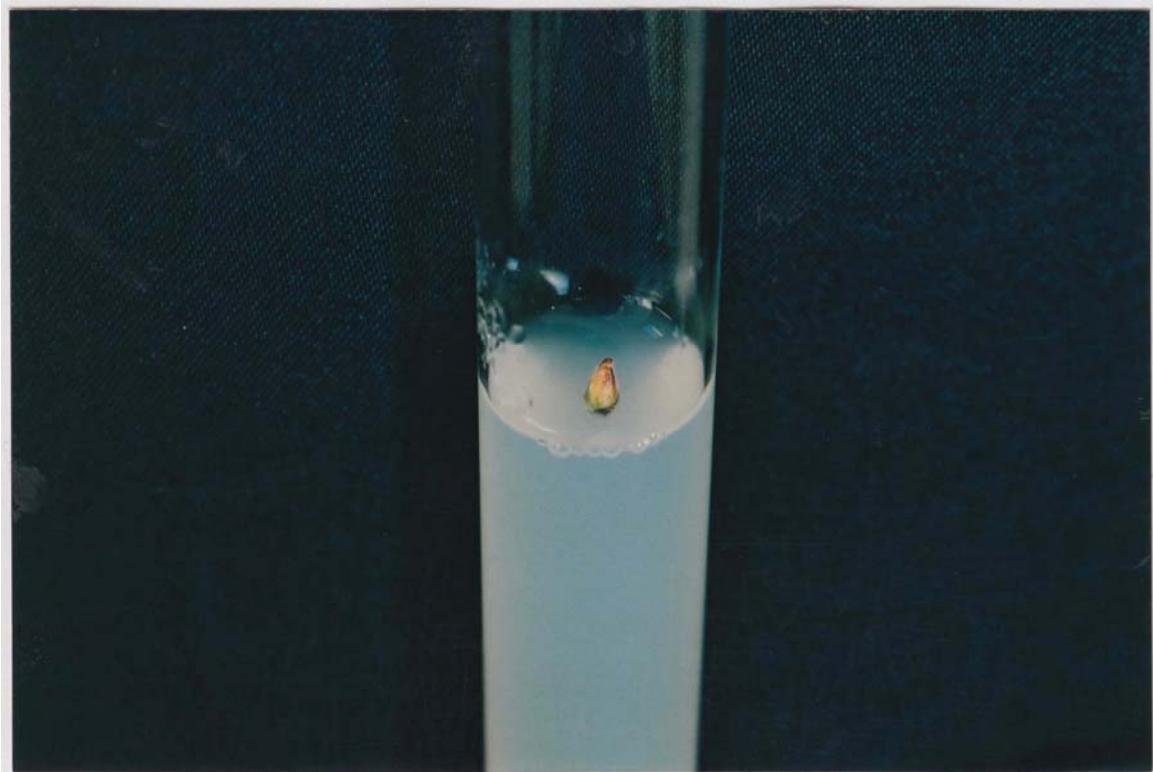
3.2.7.2.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların *in vitro* Koşullarda Mikroçoğaltılması

Ürün veren Nonpareil badem ağaçlarından (18 yaşında) alınan lateral tomurcuklar, mikroçoğaltma çalışmalarında materyal olarak kullanıldı. 1.5-2.0 cm uzunluğunda ve 2-3 tane tomurcuk içerecek şekilde kesilen materyaller musluk suyunda 3-5 dakika yıkayıp %70'lik alkolde 30 saniye çalkalanarak ön sterilizasyonu yapıldı. Materyallerin sterilizasyonu, **Bölüm 3.2.6.4** de belirtildiği gibi %10 NaOCl çözeltisi içerisinde 30 dakika süre ile bekletilerek tamamlandı. Steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak steril kurutma kağıtları üzerinde steril pens ve bistüri yardımı ile lateral tomurcuklar gövdeden ayrıldı. Tomurcukların koruyucu örtü tabakası soyularak magenda GA-7 kültür kaplarına ekimi yapıldı (Resim.5.a, b).

Tomurcukların büyümesi ve gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı 40 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 0.5 – 1.0 mg l⁻¹ BAP ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.7-5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Tomurcukların büyümesi morfolojik olarak gözlenerek rapor edildi.



Resim 5a. Lateral tomurcukların ilk ekim hali. X 1.677



Resim 5b. Lateral tomurcukların ilk ekim hali.

3.2.7.3 Nonpareil Çiçek Tomurcuklarından Kallus Oluşturma Çalışmaları

Kallus oluşturma çalışmalarında materyal olarak kullanılan çiçek tomurcukları, Mart ayının ilk haftasında Şanlıurfa - Koruklu Tarımsal Araştırma Merkezinden temin edildi. Nonpareil badem ağacından, açılmaya yakın çiçek tomurcukları alındı. Çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu **Bölüm 3.2.6.5** de belirtildiği gibi, %5'lik NaOCI içerisinde 20 dakika bekletilmek suretiyle yapıldı. Yüzey sterilizasyonu yapılan çiçek tomurcuklarının sapları steril pens ve bistüri yardımı ile kesilerek steril filtre kağıtları arasında kurutulduktan sonra, aşağıda belirtilen hormon oranlarının bulunduğu 30 g/l sakkaroz + 7 g/l agar ile desteklenmiş MS besi ortamının bulunduğu kültür tüplerine ekimi yapıldı. Kültürü yapılan tomurcuklar, 25 ± 2 °C'deki büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Kallus oluşturmak amacı ile yapılan çalışmada, bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı aşağıda verildiği gibidir.

- 2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	- 2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D + 1 mg l ⁻¹ IAA
- 4.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	- 2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D + 1 mg l ⁻¹ NAA
- 6.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	- 0.0 Kontrol

Çalışmada, her oran için 10 adet olmak üzere toplam 60 adet materyal kullanıldı.

3.2.7.4. Köklendirme Çalışmaları

3.2.7.4.1. Badem Sürgünlerinin *in vitro* Şartlarda Köklendirilmesine IAA ve NAA' in Etkisi

In vitro şartlarda, Nonpareil badem çeşidinden elde edilen sürgünlerin köklendirilme çalışmaları yapıldı. Bu amaçla köklenmeye elverişli olan sürgünler aşağıda belirtilen IAA ve NAA' in farklı oranlarının bulunduğu, 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alındı.

- 0.0 Kontrol	- 0.0 Kontrol
- 0.5 mg l ⁻¹ IAA	- 0.5 mg l ⁻¹ NAA
- 1.0 mg l ⁻¹ IAA	- 1.0 mg l ⁻¹ NAA
- 2.0 mg l ⁻¹ IAA	- 2.0 mg l ⁻¹ NAA

MS besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce KOH ile 5.7-5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Besi yerinin sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, steril kabin içerisinde kaplara (magenda GA-7) bölüştürüldü. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırılan sürgünler 2-2.5 cm uzunluğunda kesilerek röpikajı yapıldı. Her test grubu için 10 materyal olmak üzere ekimi yapılan sürgünler, sıcaklık ayarı 25 ± 2 °C olan ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda ayarlanmış kültür odasında köklenmeye bırakıldı.

3.2.7.4.2. Sürgünlerin *in vitro* Şartlarda Köklendirilmesinde Işığın Etkisi

Nonpareil badem sürgünlerinin *in vitro* köklendirilmesine ışığın etkisi test edildi. Bu amaçla IAA ve NAA'in aşağıda belirtilen oranlarının ilave edildiği, MS besi ortamı kullanıldı. Besi ortamının hazırlanması ve sterilizasyonu bir önceki köklendirilme çalışmasında olduğu gibi kullanıldı.

- 0.0	Kontrol	- 0.0	Kontrol
- 0.5 mg l ⁻¹	IAA	- 0.5 mg l ⁻¹	NAA
- 1.0 mg l ⁻¹	IAA	- 1.0 mg l ⁻¹	NAA
- 2.0 mg l ⁻¹	IAA	- 2.0 mg l ⁻¹	NAA

Yukarıda belirtilen oksin oranlarını içeren besi ortamına ekimi yapılan sürgünlerin bulunduğu kültür besi kapları, alüminyum folyolar ile kapatılarak, sıcaklık ayarı 25 ± 2 °C olan kültür odasına köklenmeye bırakıldı.

10 gün boyunca karanlıkta muhafaza edilen kültürün yarısının folyoları tamamen açılarak aydınlık ortama bırakıldı. Diğer yarısının ise sadece besi yeri kapalı kalacak şekilde yarım açıldı ve 17 gün sonra tamamen açılmak üzere folyoları çıkarıldı.

3.2.7.4.3. Sürgünlerin *in vitro* Köklendirilmesinde WPM'un etkisi

Sürgünlerin köklendirilme çalışmalarında, ¼ - 1/2 - 1/1 oranında seyreltilmiş WPM ve bu oranların yanı sıra 2/1 WPM besi ortamı da kullanıldı. Besi ortamına hormon olarak 2 mg l⁻¹ NAA, karbon kaynağı 30 g/l sakkaroz ve katılaştırma ajanı olarak da 7 g/l agar ilave edilerek hazırlandı. MS besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce 5.7-5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırılan sürgünler 2-2.5 cm uzunluğunda kesilerek besi yerinin bulunduğu magenda GA-7 kültür kaplarına röpikajı yapıldı. Her test grubu için

10 materyal olmak üzere, ekimi yapılan sürgünler sıcaklık ayarı 25 ± 2 °C olan ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda ayarlanmış kültür odasına köklenmeye bırakıldı.

3.2.7.4.4. Sürgünlerin *in vitro* Köklendirilmesinde IAA'in Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu çalışmada, Nonpareil sürgünlerinin köklendirilmesinde, yüksek IAA oranlarının etkisi, bir kontrol grubu ile birlikte ayrı ayrı test edildi. Bunun için, aşağıda belirtilen IAA oranlarının bulunduğu, 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ile desteklenen 1/2 oranında sulandırılmış MS besi ortamı kullanıldı.

- 0.0 Kontrol
- 8.0 mg l⁻¹ IAA
- 10.0 mg l⁻¹ IAA
- 12.0 mg l⁻¹ IAA

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce KOH ile 5.7-5.8'e ayarlanarak, 1 atmosfer basınçta, 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırılan sürgünler, 2-2.5 cm uzunluğunda kesilerek besi yerinin bulunduğu magenda GA-7 kültür kaplarına röpike edildi. Her test grubu için 8 materyal olmak üzere, ekimi yapılan sürgünler sıcaklık ayarı 25 ± 2 °C olan ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda ayarlanmış kültür odasına köklenmeye bırakıldı.

4. BULGULAR

4.1. Bademin (*Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil) Olgun Tohumlarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları

4.1.1. Nonpareil Badem Çeşidinin Zigotik Embriyolarından İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmalarında Sitokinlerin Etkisi

Mikroçoğaltmada sitokinlerin etkisini test etmek amacı ile kültüre alınan zigotik embriyolarından, 4 haftalık kültür dönemi sonrasında oluşan sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayısı ve köklenme oranı tespit edildi. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için, bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri yapıldı (Sigma Plot 2.0). İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde, ortalama veriler arasındaki farklılıklar, $p:0.05$ seviyesinde *t-testine* tabi tutuldu. Deney sonucunda elde edilen veriler **Tablo.5** ve **Tablo.6** verilmiştir. Eksplantların kültüre alınmasından 3 gün sonra, zigotik embriyoların radikula kısmında hacim artışı (şişme) olduğu görüldü.

Bir haftalık inkübasyon sonrasında çimlenme oranına bakıldığında, kontrol grubu (hormon içermeyen) ile birlikte sitokinin konsantrasyonlarının hemen hemen hepsinde çimlenme olduğu belirlendi. Çimlenmenin başlaması ile birlikte, 10 günlük kültür dönemi sonrası gövde ve sekonder yaprakların oluşumu oldukça belirginleşti. **Tablo.5'**deki veriler, sürgün oluşumunun kullanılan BAP oranı ile değiştiğini göstermektedir.

Kontrol grubunda 1.3 adet sürgün oluşurken $0.5-1.0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP'lı ortamda 11-15 adet civarında sürgün oluşmuştur. Buna karşın yüksek BAP ($2.0- 4.0 \text{ mg l}^{-1}$) oranlarında yeni sürgün oluşumu açısından önemli bir düşüş görülmüştür (Resim.6a,b).

Bu gruplar *t*-testi ile karşılaştırıldığında da, önemli istatistiksel farklılıkların olduğu görüldü ($P<0.05$).

Tablo.5 te görüldüğü gibi, BAP oranları ve kontrol grubu ile yapılan denemelerde, sürgün ve nod sayısı bakımından en iyi sonuçların düşük BAP ($0.5-1.0 \text{ mg l}^{-1}$) oranlarında meydana geldiği tespit edildi (Resim.6.c, d).

Tablo.5. Zigotik embriyoların *in vitro* çoğaltılmasına BAP konsantrasyonlarının etkisi.

İşlemler	Çimlenme oranı(%)	Sürgün boyu (cm)	Sürgün sayısı	Nod sayısı	Köklenme (%)
Kontrol	100	4.1 ± 0.31a	1.3 ± 0.15c	5.3 ± 0.39a	80
0.5 mg l ⁻¹ BAP	100	4.1 ± 0.23a	11.0 ± 1.32a	5.7 ± 0.53a	60
1.0 mg l ⁻¹ BAP	100	4.3 ± 0.39a	14.7 ± 2.12a	4.3 ± 0.29b	70
2.0 mg l ⁻¹ BAP	100	3.1 ± 0.10b	6.2 ± 0.63b	3.9 ± 0.14cd	40
4.0 mg l ⁻¹ BAP	60	3.3 ± 0.33ab	6.8 ± 0.71b	3.1 ± 0.23d	40

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Kültüre alınan zigotik embriyolardan gelişen sürgünlerin köklenme oranlarına bakıldığında, en yüksek köklenmenin %80 ile kontrol (hormonsuz) grubunda olduğu görüldü. **Tablo.5.** de görüldüğü gibi, sürgün oluşumunun iyi olduğu düşük BAP oranlarında köklenme oranının da yüksek olduğu tespit edildi. Buna karşın sürgün veriminin daha az olduğu yüksek BAP oranlarında köklenmenin de düşük olduğu görüldü.

Tablo.6. Zigotik embriyoların *in vitro* çoğaltılmasına Kinetin konsantrasyonlarının etkisi.

İşlemler	Çimlenme oranı (%)	Sürgün boyu (cm)	Sürgün sayısı	Nod sayısı	Köklenme (%)
Kontrol	100	4.1 ± 0.31a	1.3 ± 0.15a	5.3 ± 0.39a	80
0.5 mg l ⁻¹ Kin	100	4.2 ± 0.41a	1.7 ± 0.49a	5.7 ± 0.71a	80
1.0 mg l ⁻¹ Kin	100	3.5 ± 0.30a	1.7 ± 0.39a	4.7 ± 0.65a	40
2.0 mg l ⁻¹ Kin	100	3.7 ± 0.53a	1.8 ± 0.41a	5.6 ± 0.70a	60
4.0 mg l ⁻¹ Kin	100	4.2 ± 0.31a	2.0 ± 0.29a	6.1 ± 0.67a	40

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Tablo.6. deki veriler, kinetin ve kontrol grubunda, zigotik embriyolardan gelişen bitkiciklerde 1-2 yeni sürgün oluşumu dışında, apikal büyümenin daha fazla olduğunu göstermektedir. Kullanılan kinetin oranlarının, sürgün oluşumunda etkili olmadığı gözlemlendi. Kinetin oranlarında oluşan sürgün sayısı (1.7-2.0 adet), kontrol grubunda oluşan sürgün sayısı (1.3 adet) ile hemen hemen aynı olmuştur (Resim.7, 8).

Tablo.6'da görüldüğü gibi kinetin ve kontrol grubu ile yapılan denemelerde, sürgün, nod sayısı ve köklenme oranı bakımından sonuçların değişmediği ve bu gruplar *t-testi* ile de karşılaştırıldığında, istatistiksel farklılıkların olmadığı görüldü ($P>0.05$).

Sürgün gelişimi açısından sitokinin çeşitleri (BAP ve kinetin) karşılaştırıldığında, BAP'nın düşük konsantrasyonlarında (0.5-1.0 mg l⁻¹) zigotik embriyolardan gelişen bitkiciklerde çok sayıda yan sürgün oluştuğu ve apikal büyümenin durduğu tespit edildi. Oluşan

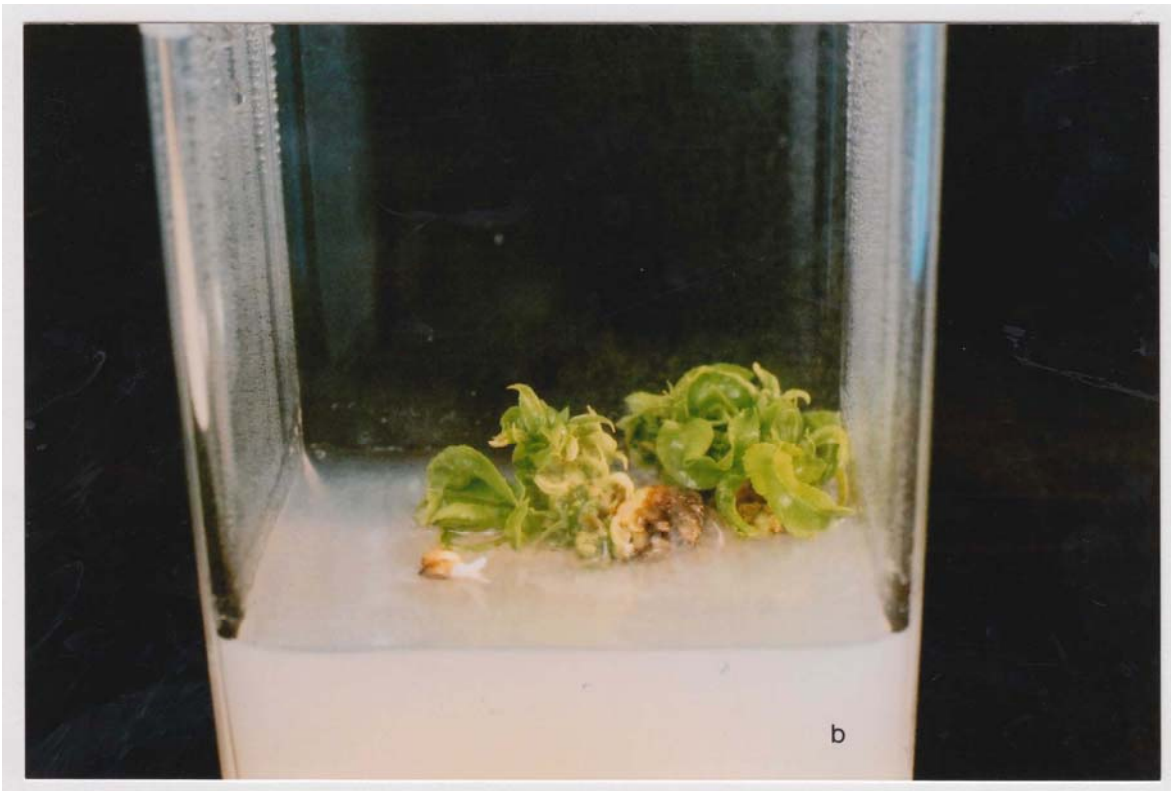
sürgünlerin boyu kısa, yaprak sayısının fazla ve yaprakların ince olduğu gözlemlendi. Kinetin ve kontrol grubunda ise, apikal büyümenin daha hızlı devam ettiği, yan sürgün oluşumunun da durduğu belirlendi. Kinetin konsantrasyonlarında oluşan bitkiciklerin yaprakları geniş, koyu-yeşil ve az sayıda, buna karşın BAP oranlarında oluşan bitkiciklerin yapraklarının küçük, ince ve çok sayıda olduğu belirlendi.

En iyi köklenmenin, kontrol ve kinetin düşük konsantrasyonlarında (%80) olduğu tespit edildi. Kültüre alındıktan 3 hafta sonra zigotik embriyolardan oluşan bitkiciklerde primer köklerin oluşmaya başlamasının ardından, sekonder köklerin de hızlı bir şekilde geliştiği görüldü. Uzun primer köklerin yanı sıra çok sayıda sekonder kök oluşumuna tanık olundu. BAP oranlarında köklenmenin daha az ve yavaş (sayı ve kök uzunluğu bakımından) geliştiği tespit edildi.

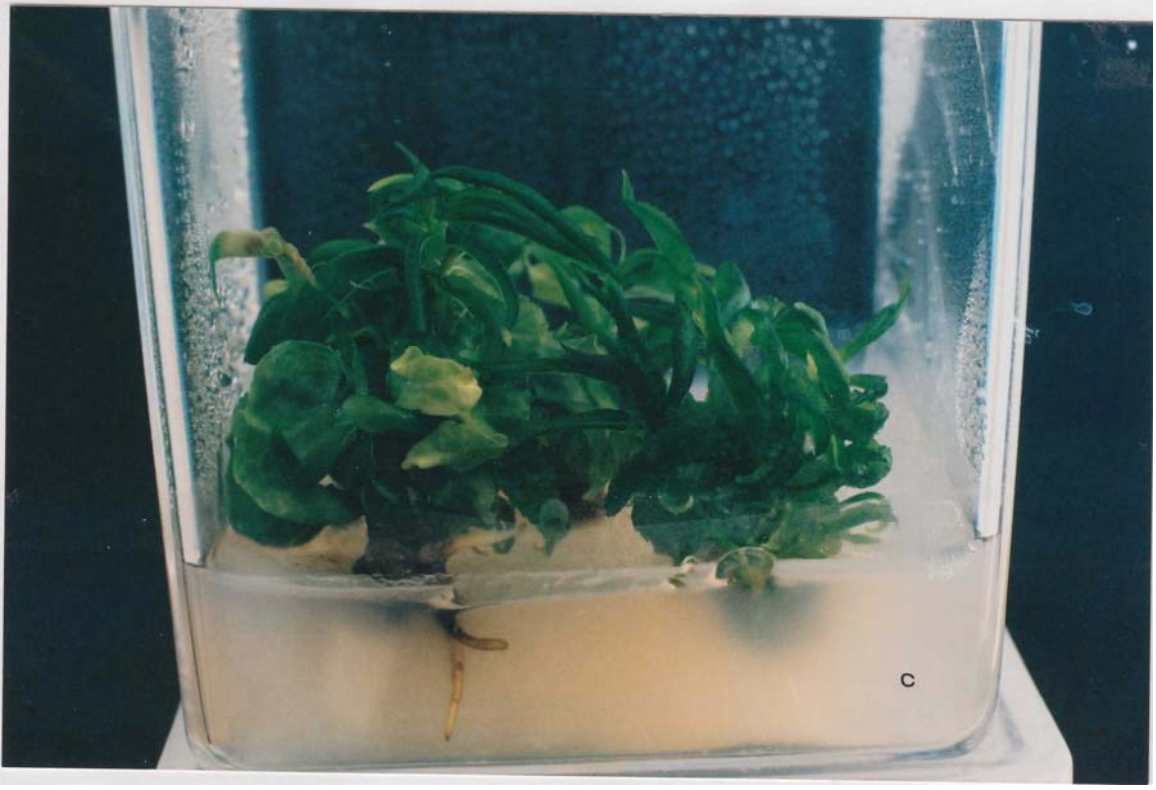
Zigotik embriyoların mikroçoğaltılmasında sitokininlerin etkisini araştırma çalışmalarında, elde edilen verilerin dikkat çekici özet sonuçları şöyledir.

- En uzun sürgün boyu..... 0.5 mg l⁻¹ kinetin -7 cm
- En fazla sürgün sayısı.....1.0 mg l⁻¹ BAP - 28 tane
- En az sürgün sayısı.....kontrol ve kinetin (0.5 - 1.0 - 2.0 mg l⁻¹)
- En fazla yaprak sayısı.....0.5-1.0 mg l⁻¹ BAP
- En uzun kök.....0.5 mg l⁻¹ kinetin- kontrol (9 cm)

Yapılan deney sonucunda zigotik embriyolardan itibaren mikroçoğaltma çalışmalarında en iyi verilerin düşük BAP konsantrasyonu içeren kültür besi ortamlarında olduğu tespit edildi.



Resim 6a. 2.0 mg l^{-1} BAP'lı **b.** 4.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü X 1.423 x 1.542



Resim 6c. 0.5 mg l^{-1} BAP'lı **d.** 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü. X 1.779 x 1.169



Resim 7. Hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü. X 1.440



Resim 8. Kinetin içeren MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü. X 1.474

4.1.2. *İn vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Zigotik embriyolardan gelişen sürgünlerin proliferasyonuna, BAP'ın 0.1-0.5-1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ lik konsantrasyonları ayrı ayrı test edildi.

Bu amaçla zigotik embriyolar, öncelikle hormonsuz MS besi ortamında 2 hafta süre ile gelişmeye bırakıldı. *İn vitro* şartlarda gelişen sürgünler, daha sonra yukarıda belirtilen BAP konsantrasyonlarında kültüre alınarak gelişimleri takip edildi. 4 haftalık kültür dönemi sonrası oluşan sürgün sayısı, sürgün boyu, nod ve yaprak sayısı tespit edildi. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için, bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri yapıldı (Sigma Plot 2.0). İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde, ortalama veriler arasındaki farklılıklar, P: 0.05 seviyesinde *t*-testine tabi tutuldu. Deney sonucunda elde edilen veriler **Tablo.7**'de verildi.

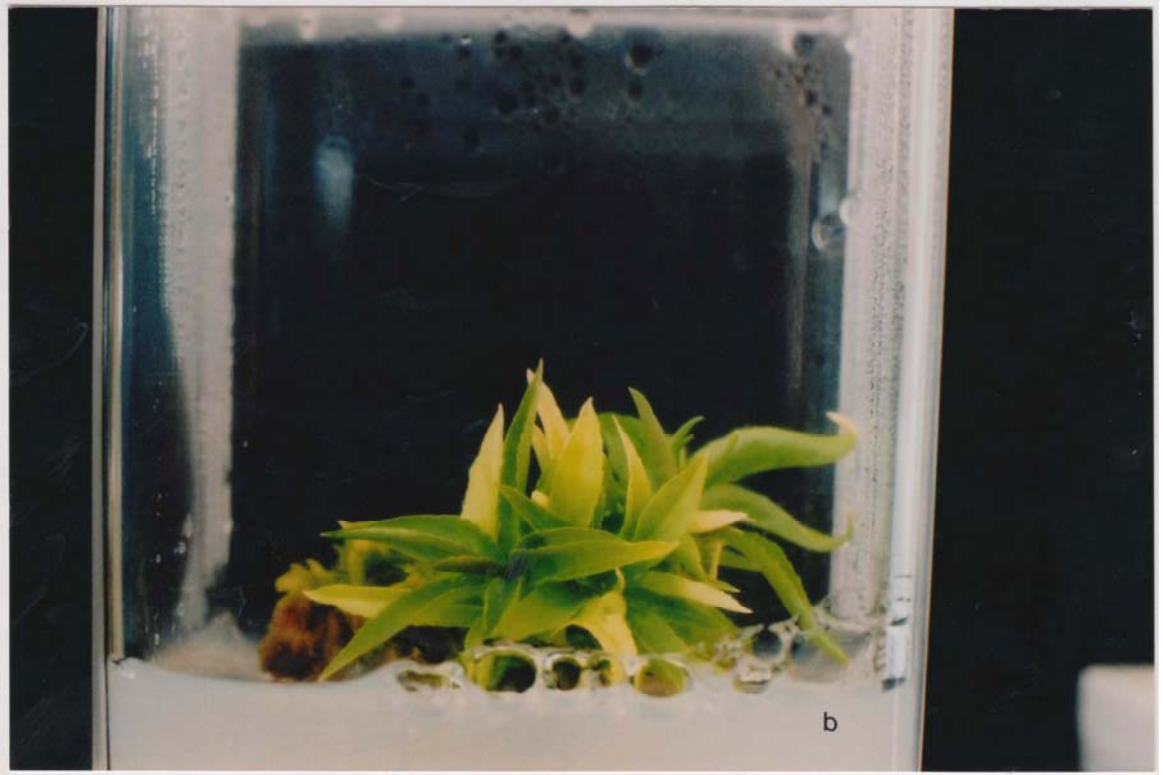
Tablo.7. Zigotik embriyolardan oluşan sürgünlerin proliferasyonuna BAP konsantrasyonlarının etkisi.

İşlemler	Sürgün boyu (cm)	Sürgün sayısı	Nod sayısı	Yaprak sayısı
0.1 mg l ⁻¹ BAP	2.9 ± 0.24a	2.2 ± 0.35a	3.0 ± 0.52a	13.2
0.5 mg l ⁻¹ BAP	3.0 ± 0.25ac	3.2 ± 0.48b	3.7 ± 0.63ab	18.7
1.0 mg l ⁻¹ BAP	3.9 ± 0.27b	5.1 ± 0.62c	6.4 ± 0.81b	30.0
2.0 mg l ⁻¹ BAP	3.6 ± 0.27bc	5.7 ± 1.04c	4.4 ± 0.60b	21.7

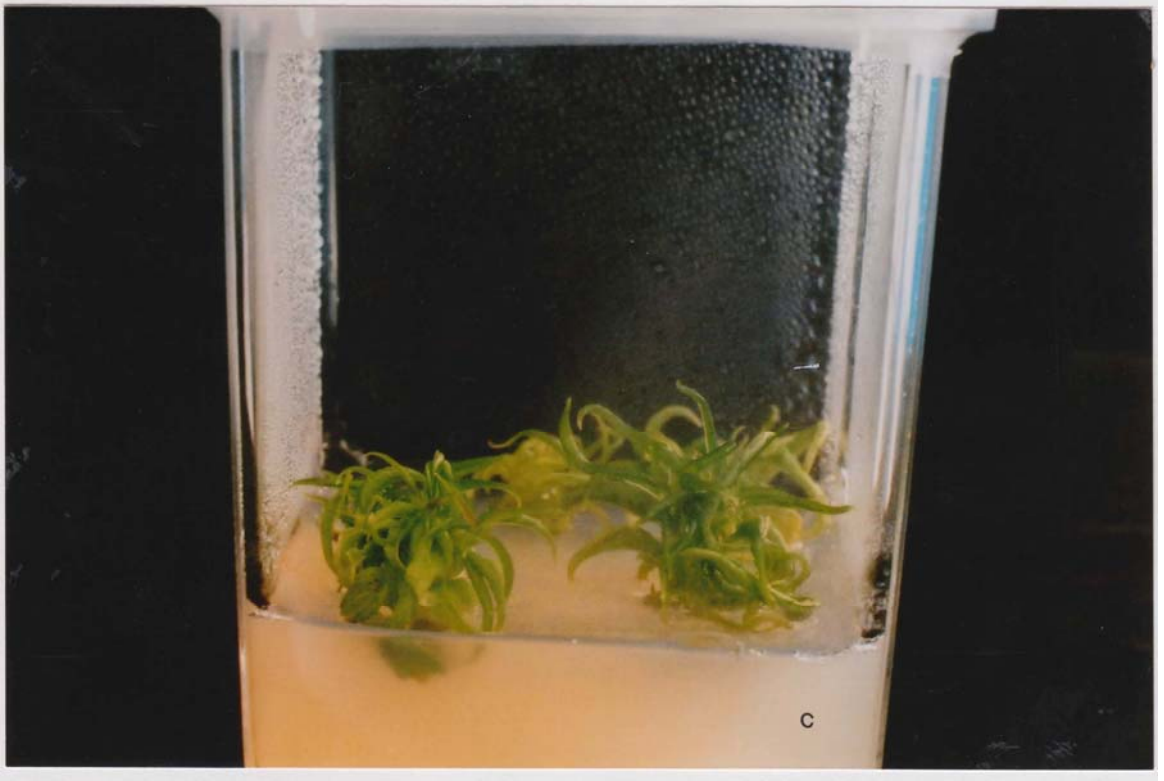
Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Tablo.7'deki veriler ışığında, zigotik embriyolardan gelişen sürgünlerin proliferasyonu için 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren temel besi ortamının, diğer BAP oranlarına nazaran daha iyi olduğu görülmektedir (Resim: 9a,b,c,d). 0.1 ve 0.5 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında 2-3 adet sürgün oluşurken, BAP'ın 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ lik konsantrasyonlarında 5-6 adet sürgün oluştuğu tespit edildi. Gruplar *t*-testi ile karşılaştırıldığında da, önemli istatistiksel farklılıkların olduğu görüldü (P<0.05).

Yapılan deneyler sonucunda zigotik embriyoların mikroçoğaltılmasında ve sürgün proliferasyonunda en iyi sonuçların 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında olduğu görüldü.



Resim 9 Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna **a.** 0.1 mg l^{-1} BAP, **b.** 0.5 mg l^{-1} BAP'ın etkisi. X 1.864 x1.796



Resim 9. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna **c.** 1.0 mg l^{-1} BAP **d.** 2.0 mg l^{-1} BAP'ın etkisi. X 1.406 x 1.813

4.1.3. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Oksin Çeşidi ve Oksin Oranlarının Etkisi

Önceki deneylerde, zigotik embriyolardan itibaren mikroçoğaltma ve sürgün proliferasyonunda en iyi sonuçların 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında elde edildiği saptandı. Bu sonuç değerlendirilerek, sürgün proliferasyonuna oksinlerin etkisini saptamak amacı ile **Tablo.8**'de verildiği gibi, 1.0 mg l⁻¹ BAP oranı sabit tutularak 2 çeşit oksinin farklı konsantrasyonları test edildi. 0.5-1.0 cm boyundaki sürgünler, 1 nod ve 2-5 yaprak içerecek şekilde kesilerek **Bölüm 3.2.7.1.3.** de anlatıldığı gibi kültüre alınarak gelişimleri gözlemlendi.

Tablo.8. Zigotik embriyolardan oluşan sürgünlerin proliferasyonuna IAA ve NAA'nin etkisi

İşlemler	Sürgün boyu	Sürgün sayısı	Nod sayısı	Kallus
0.1 mg l ⁻¹ NAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	0.8 ± 0.12abc	1.7 ± 0.36a	1.3 ± 0.37ab	Çok az
0.2 mg l ⁻¹ NAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	0.9 ± 0.13c	1.2 ± 0.36ab	1.3 ± 0.32b	Az
0.5 mg l ⁻¹ NAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	1.2 ± 0.22abc	2.3 ± 0.46abc	1.8 ± 0.35ab	Çok
0.1 mg l ⁻¹ IAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	1.4 ± 0.33abc	1.8 ± 0.26abc	2.5 ± 0.37a	Yok
0.2 mg l ⁻¹ IAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	1.3 ± 0.18b	1.4 ± 0.24b	1.8 ± 0.37ab	Yok
0.5 mg l ⁻¹ IAA+1.0 mg l ⁻¹ BAP	1.5 ± 0.25a	2.8 ± 0.51c	2.0 ± 0.37ab	Yok

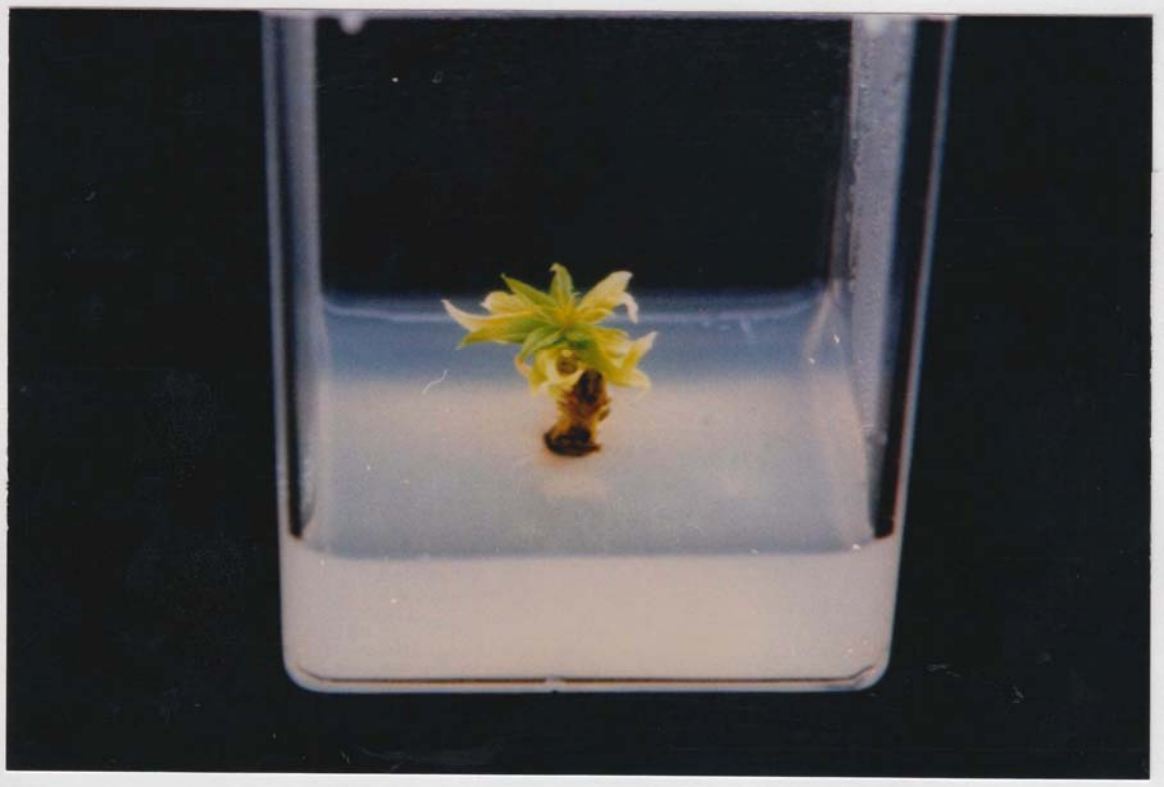
Rakamlar kültürün 28.gününde toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Dört haftalık kültür dönemi sonunda alınan verilere göre, 1.0 mg l⁻¹ BAP ile birlikte kullanılan değişik konsantrasyonlardaki IAA'li besi ortamlarında kültüre alınan materyallerde sürgün oluşumu, sürgün boyu ve nod sayısında artış görülürken, kallus ve kök oluşumuna rastlanmadı. Sürgün sayısının en fazla, 0.5 mg l⁻¹ IAA +1.0 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında olduğu tespit edildi. BAP ile desteklenmiş temel besi ortamına ilave edilen IAA oranlarında gelişen bitki grupları *t*-testi ile karşılaştırıldığında, farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$).

1.0 mg l⁻¹ BAP ile birlikte kullanılan değişik konsantrasyonlardaki NAA'in bulunduğu besi ortamlarında ise, sürgün sayısı daha az (0-4 adet arası) ve hatta bazı materyallerde sürgün oluşumu görülmedi (0.1 ve 0.2 mg l⁻¹ NAA).

Sürgün boyu ve sayısı açısından 0.5 mg l⁻¹ NAA + 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamlarının iyi sonuç verdiği belirlendi. BAP ile desteklenmiş temel besi ortamına ilave edilen NAA oranlarında gelişen bitki grupları *t*-testi ile karşılaştırıldığında, farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.05$). Aynı zamanda bu oranda materyalin taban kısmından itibaren çok miktarda sarımsak ve kahverengi kallus oluşumu da görüldü.

Tablo.8' deki verilerden anlaşılacağı gibi, oksin oranları arasında 0.5 mg l^{-1} IAA ve NAA'in sürgün proliferasyonu için en iyi sonuçları verdiği istatistiksel açıdan da tespit edildi. Gruplar arasında yapılan *t*-testinden, sürgün proliferasyonuna sitokinin yanında oksin çeşidinden ziyade, oksin konsantrasyonunun daha etkili olduğu belirlendi (Resim:10).



Resim 10. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 1.0 mg l^{-1} BAP + Oksinlerin etkisi. X 1.338

4.1.4. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna MS Miktarlarının Etkisi

Sürgün proliferasyonuna, MS yoğunluğunun etkisini tespit etmek amacı ile besi ortamının hazırlanışı ve ekim işlemleri, **Bölüm.3.2.7.1.4.** de anlatıldığı gibi uygulandı. Sürgünlerin morfolojik gelişimleri kültür dönemi boyunca gözlenerek aşağıdaki veriler tespit edildi.

Kültüre alındıktan bir hafta sonra, 2/1 MS oranının, sürgün proliferasyonu için en iyi besi ortamı olduğu görüldü. Bu oranda kültüre alınan sürgünlerde, solma olmadığı gibi

yeni yaprak ve sürgün gelişimine de tanık olundu. Yaprakların canlı-yeşil ve apikal büyümenin, test edilen MS oranları içinde en iyisi olduğu tespit edildi. 1/1 MS oranında kültüre alınan sürgünlerde yaprakların canlı-yeşil ve solmanın çok az olduğu görüldü. Sürgünlerde apikal büyümenin yanı sıra sürgün gelişiminin de iyi olduğu gözlemlendi.

1/2 MS oranında kültüre alınan sürgünlerde az dahi olsa apikal büyümenin olduğu ve bunun yanı sıra yapraklarda solmanın da az miktarda görüldüğü saptandı.

1/4 MS oranında kültüre alınan sürgünler, gelişmediği gibi yapraklarda solma ve kahverengileşme olduğu görüldü.

İlk üç hafta içerisinde 2/1 MS besi ortamında bulunan bitkiciklerde gelişme çok hızlı ilerlerken yaprakların iri, koyu yeşil ve yaprak sayısının fazla olduğu saptandı. Yirmi beşinci günden sonra ise yaşlı yapraklardan başlamak üzere sararma olduğu görüldü. Bu oranda kültüre alınan materyallerin %30'unda çok sayıda sürgün oluştuğu ve sürgün boyunun yaklaşık 5.0 cm olduğu saptandı. Kültüre alınan diğer materyallerde ise, 1.0-2.5 cm civarında ve daha az sayıda sürgün oluştuğu tespit edildi (Resim.11).

1/2 MS besi ortamında kültüre alınan materyallerin %50'sinde sürgün sayısı fazla olmasına rağmen, genç ve yaşlı yapraklarda sararma ile birlikte kuruma olduğu tespit edildi. 1.5-3.0 cm uzunluğunda olan sürgünlerin yaprakları morfolojik olarak doğal ortamda yetişenler ile benzerlik gösterdiği belirlendi (Resim.12).

1/4 MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerde, boy uzunluğu sınırlı kalıp bitkiciklerin genel görünümünün test edilen MS serileri arasında en kötüsü olduğu belirlendi. Test edilen diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, yaprak sayısının daha az ve açık yeşil renkte olduğu tespit edildi (Resim.13).

1/1 MS besi ortamında kültüre alınan sürgünler morfolojik özellikleri ile doğal ortamlarda yetişen badem sürgünleri ile paralel bir gelişme gösterirken, yaprak sararmasının da en az görüldüğü oran olarak belirlendi.

İn vitro koşullarda uzun süre kültürde muhafaza edilmesine rağmen yeni yaprak ve sürgün proliferasyonu bakımından test edilen MS oranları içerisinde kültüre en iyi cevap veren ve en ideal oranın 1/1 MS besi ortamı olduğu çalışmalarla tespit edildi (Resim.14).



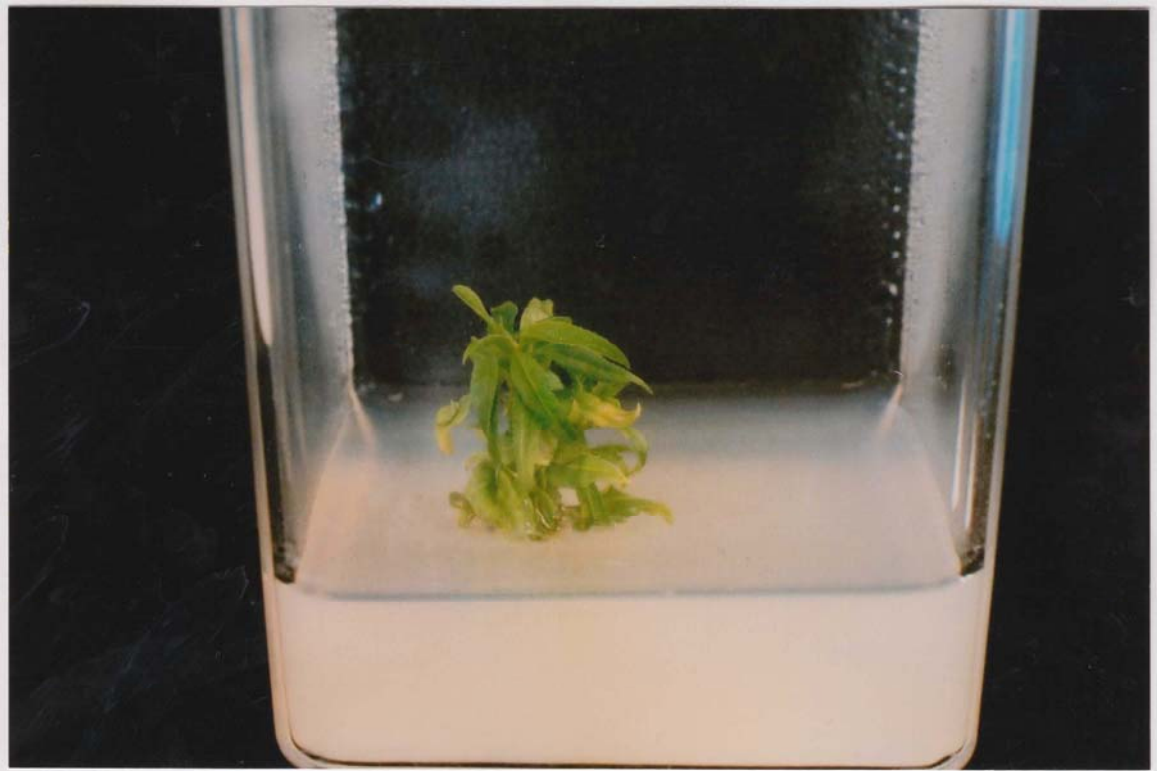
Resim 11. 2/1 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi. X 0.881



Resim 12. 1/2 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi. X 0.966



Resim 13. 1/4 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi. X 1.084



Resim 14. 1/1 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi. X 1.593

4.1.5. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Şeker Çeşidinin Etkisi

Sürgün proliferasyonuna, şeker çeşidinin etkisini tespit etmek için yapılan kültür çalışmalarında, aşağıdaki veriler elde edilmiştir. Üç haftalık kültür dönemi sonunda 30 g/l sakkarozlu besi ortamında bulunan sürgünlerin %30'unda yeni sürgün ve yaprak oluşumunun olduğu tespit edildi. Çok sayıda oluşan yeni yaprakların morfolojik olarak, ince, uzun ve koyu yeşil renkte olduğu belirlendi. Üç haftadan sonra genç yapraklardan başlamak üzere bitkilerde sararma ve kuruma olduğu görüldü. Ayrıca bitkiciklerde 0.2 -0.6 cm kadar boy uzaması tespit edildi.

30 g/l maltoz bulunan besi ortamında kültüre alınan sürgünlerde gelişmenin oldukça yavaş, yeni yaprak ve sürgün oluşumunun da diğer şeker çeşitlerine göre daha az olduğu tespit edildi. Oluşan yeni yaprakların geniş, kısa ve iç içe kıvrık olduğu ve bu haliyle morfolojik olarak diğer şeker çeşitlerindeki sürgünlerin yapraklarından oldukça farklı olduğu belirlendi. Test edilen şeker çeşitleri arasında en iyi sürgün proliferasyonu ve gelişmesi 30 g/l dektroz bulunan kültür besi ortamında olduğu tespit edildi. Kültüre alınan sürgünlerin %60'ında yeni sürgün ve yaprak oluşumu görüldü. Oluşan yaprakların çok sayıda ince ve uzun olduğu belirlendi. Ayrıca sürgünlerde en iyi boy uzaması (0.4 - 1.0 cm) yine bu ortamda tespit edildi. Üç haftalık kültür döneminden sonra genç yapraklardan başlamak üzere sürgünlerde sararma olduğu ve alt kültüre alınması gerektiği saptandı.

4.1.6. *In vitro* Şartlarda Elde Edilen Badem Sürgünlerinin Proliferasyonuna Materyal Şeklinin Etkisi

Proliferasyona materyal şeklinin etkisini tespit etmek amacı ile yapılan kültür çalışmalarında uygulanan yöntem, **Bölüm.3.2.7.1.6.**da verildiği gibi yapılarak, kültür süresi boyunca sürgünlerin gelişimi aşağıda verildiği gibi tespit edildi.

Kültüre alınan eksplantların gelişimi 4 hafta boyunca gözlemlendi. Nod içermeyen (internod) eksplantlarda gelişme belirtisine rastlanmadığı gibi, üst kısımlardan itibaren hafif bir kararma olduğu tespit edildi. Bir nod içeren eksplantların ise, yaprak sayısı az olan 1-3 adet sürgün oluşturduğu görüldü (Resim:15).

Sonuç olarak, zigotik embriyolardan oluşan sürgünlerin kısa sürede seri bir şekilde çoğaltılması için zigotik embriyodan sonraki başlangıç materyalinin nodlu ve yapraklı (sürgün) olması gerektiği, internod ve nod içeren yapraksız materyallerin daha az verimli

olduğu tespit edildi. Böylece hızlı fide oluşturmada kùltùre alınan materyal şeklinin önemli olduğu belirlendi.



Resim 15. Bir nodlu materyallerin kùltùre alındıktan 4 hafta sonraki genel görünüşü. X 1.694

4.1.7. Zigotik Embriyolardan *in vitro* Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin mikroçoğaltılması

Zigotik embriyoların mikroçoğaltımı için MS besi ortamına 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 0.5 – 1.0 mg l⁻¹ BAP ilave edildi. İlk ekim işleminden sonra gelişen sürgünler, çoğaltılma amacı ile yukarıda belirtilen MS besi ortamına dört haftalık aralıklarla alt kùltùre alındı.

4 haftalık kùltür dönemi sonunda her bir zigotik embriyodan 1.5 - 3.5 cm boyunda 4-5 sürgünlü ve bir kısmı ise köklü olan bitkiler oluştuğu gözlemlendi. 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kùltùre alınan zigotik embriyoların 0.5 mg l⁻¹ BAP'lı ortama göre çok sayıda sürgün oluşturduğu tespit edildi (Resim:16).



Resim 16. 1.alt kültür sonunda 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü. X 1.847

0.5 – 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı ortamda oluşan sürgünler sayılarak herhangi bir işleme tabi tutulmadan yine aynı besi ortamlarında 1. alt kültürleri yapıldı. Kültüre alınan sürgünler, 16/8 fotoperiyota ayarlanmış kültür odasında gelişmeye bırakıldı.

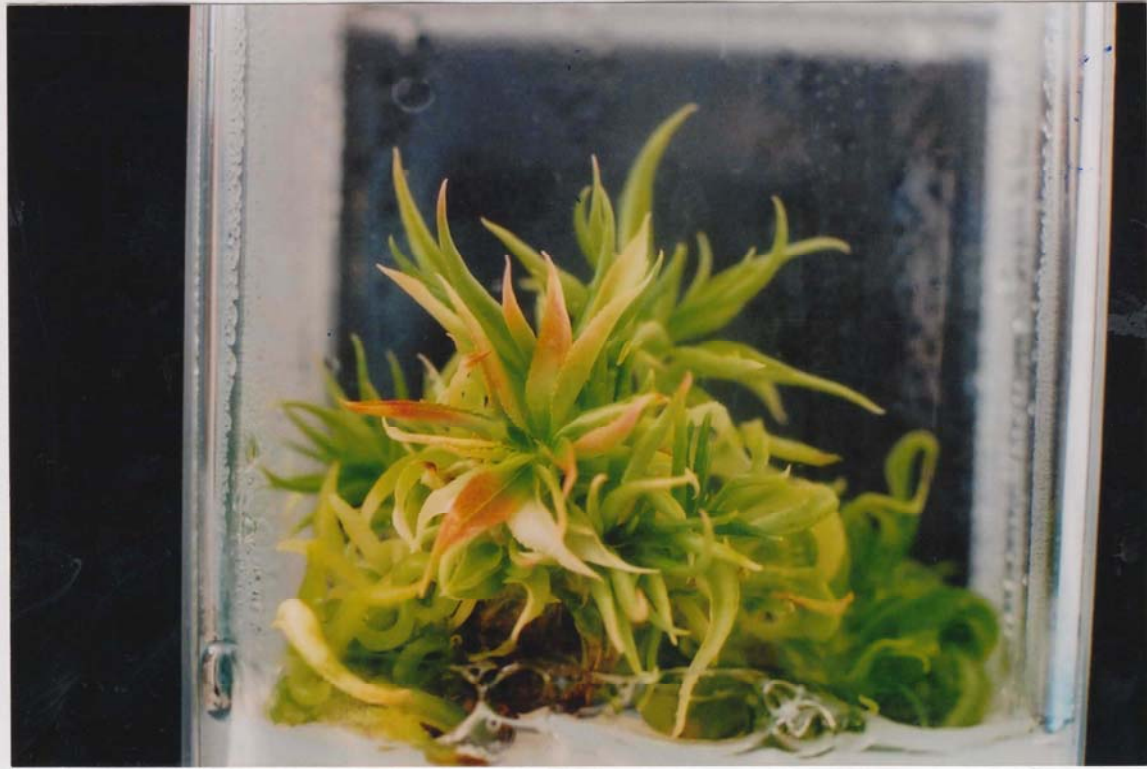
Sonuç olarak **Tablo.9'**da verildiği gibi, 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında 1.alt kültür sonunda toplam 10 tane zigotik embriyodan 147 tane elverişli sürgün, 0.5 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında ise 110 tane sürgün elde edildi. Oluşan bu sürgünlerin 2.alt kültürleri sonunda 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında toplam 750 tane, 0.5 mg l⁻¹ BAP'ta ise 326 tane sürgün elde edildi (Resim:17, 18).

0.5 ve 1.0 mg l⁻¹ BAP'ın yanında kontrol (hormonsuz) grubu da test edildi. Hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınan 10 tane zigotik embriyodan 2. alt kültür sonunda 20 tane sürgün elde edildi.

Tablo.9. 0.5 –1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan oluşan sürgün sayısı

İşlemler	I. alt kültür sonunda oluşan sürgün sayısı (adet)	II. alt kültür sonunda oluşan sürgün sayısı (adet)
Kontrol (hormonsuz)	10	20
0.5 mg/l BAP	110	326
1.0 mg/l BAP	147	750

Yapılan çalışmalar ile, 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kültüre alınan 10 tane zigotik embriyodan kısa bir süre içerisinde (2.5-3 ay) çok sayıda sürgün oluşabileceği ve 1.0 mg l⁻¹ BAP'ın mutlak gerekli olduğu tespit edildi.



Resim 17. 2.alt kültür sonunda 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü.
X 1.949



Resim 18. 2.alt kültür sonunda 0.5 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü.
X 1.322

4.2. Ürün Veren Nonpareil Badem Ağaçlarından İtibaren Organogenesis Çalışmaları

4.2.1. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının *in vitro* Koşullarda Mikroçoğaltılması

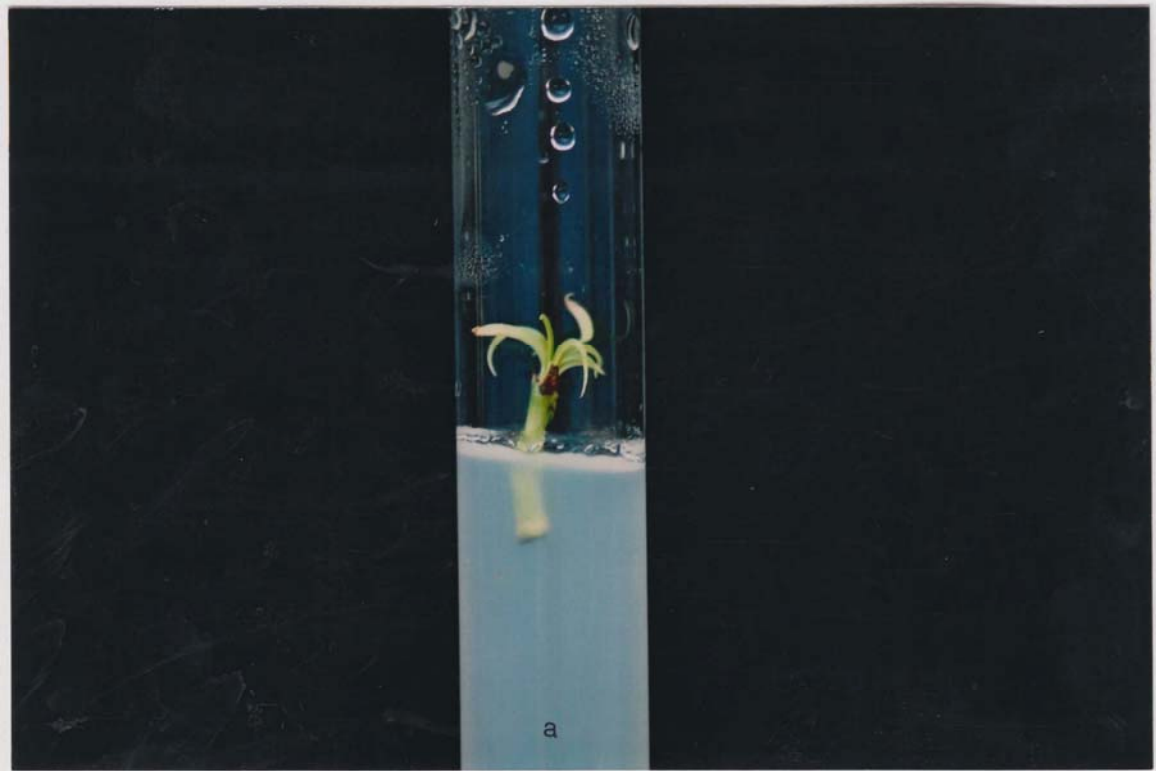
Bölüm 3.2.7.2.2. de belirtilen şekilde kültüre alınan 3-4 adet açılmamış yaprak taslağı içeren sürgün uçlarında, bir hafta sonra yapraklarda açılma ile birlikte büyümenin başladığı gözlemlendi. İki haftalık kültür süresi sonunda internodların uzaması ile yeni yaprakçıkların geliştiği belirlenerek bitkinin genelinde yeni sürgün oluşumunun olmadığı tespit edildi. Kültüre alındıktan üç hafta sonra sürgünlerde büyümenin yavaşladığı saptanarak 1.0 mg l^{-1} BAP'lı besi ortamına çoğaltma amacı ile alt kültürleri yapıldı (Resim:19a).

Alt kültüre alındıktan sonra sürgünlerin gelişiminin daha hızlı olduğu tespit edildi. Yaprakların büyümesi ile birlikte çok sayıda yeni yaprak oluştuğu ve yaprakların koyu yeşil renkte olduğu görüldü. İlk kültüre alındığında $0.5 - 1.0 \text{ cm}$ uzunluğunda olan sürgün uçlarının, alt kültüre alındıktan sonra yaklaşık $1.5 - 2.0 \text{ cm}$ uzunluğuna eriştiği belirlendi.

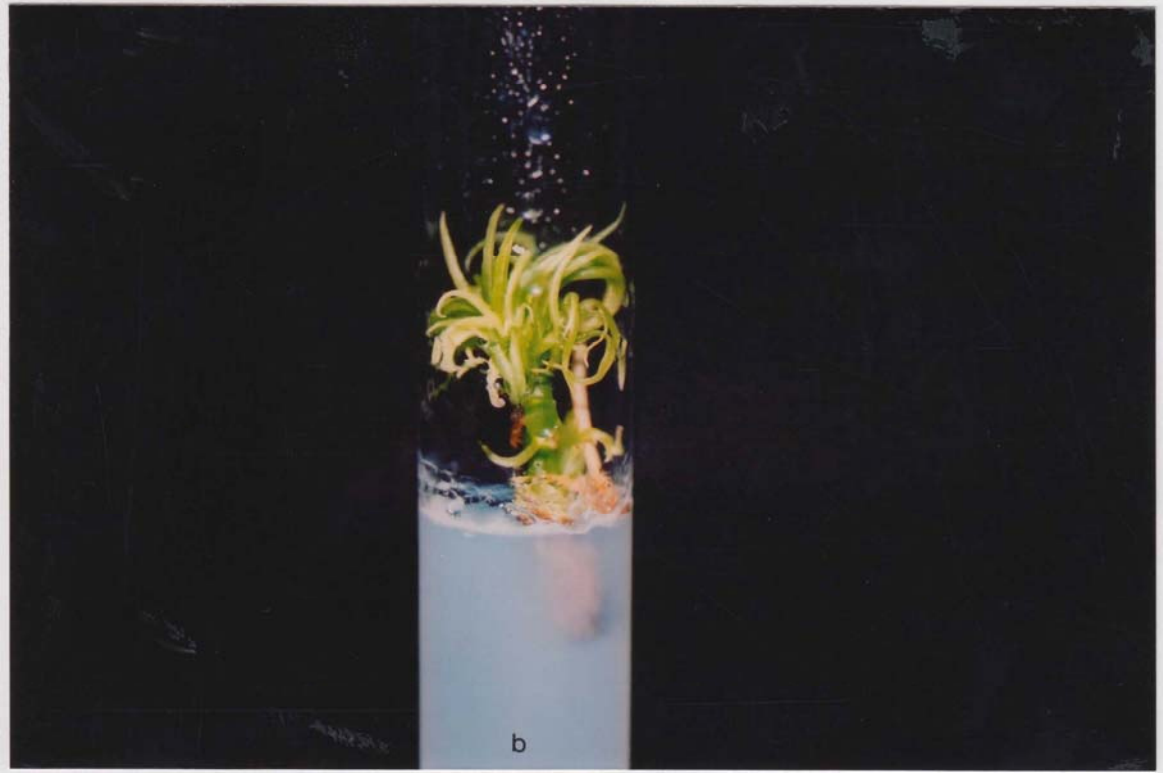
Üçüncü haftadan sonra besi yerine yakın olan ilk yaprakların hafif sararmaya başlaması ile tekrar alt kültüre alındı (Resim:19b).

İlk ekim aşamasında, tek sürgünlü olan materyallerin gelişmesi yavaş iken 1.0 mg l^{-1} BAP'lı besi ortamına alt kültürü yapıldıktan sonra büyümenin hızlandığı belirlendi. Alt kültür işlemleri sonunda her bir sürgün ucundan 1-5 adet arası yeni sürgün oluştuğu ve sürgünlerin çok sayıda yaprak içerdiği görüldü. Oluşan yeni sürgünler yine 1 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamında mikroçoğaltma amacı ile alt kültüre alındı.

Sürgün uçlarından itibaren mikroçoğaltma çalışmaları, dört haftada bir yapılan alt kültür işlemleri ile sekiz ay boyunca devam ettirildi. Yapılan her alt kültürde sürgünlerde gelişme ve büyümenin kademeli olarak ileriye gittiği tespit edildi. Dört haftadan fazla süre ile besi ortamında muhafaza edilen sürgünlerde ise, yaprakların sararması ile gelişmenin durduğu belirlendi. Bu veriler ışığında sürgün uçlarının, dört haftada bir mutlaka kültür besi ortamının değiştirilmesi gerektiği saptandı. 1 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamında ilk ekimi yapılan sürgün uçlarının, 3 - 3.5 ay sonra yaprak ve gövde morfolojisi bakımından ana bitkiye benzer sürgünler oluşturduğu belirlendi. Sürgün uçlarının 1 mg l^{-1} BAP'lı ortamda %70-80 oranında çoğaldığı tespit edildi (Resim:19c).



Resim 19 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan sürgün uçlarının a.1.alt kültür sonundaki genel görünüşü



Resim 19 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan sürgün uçlarının **b.** 2. alt kültür **c.** 3. alt kültür sonundaki genel görünüşü

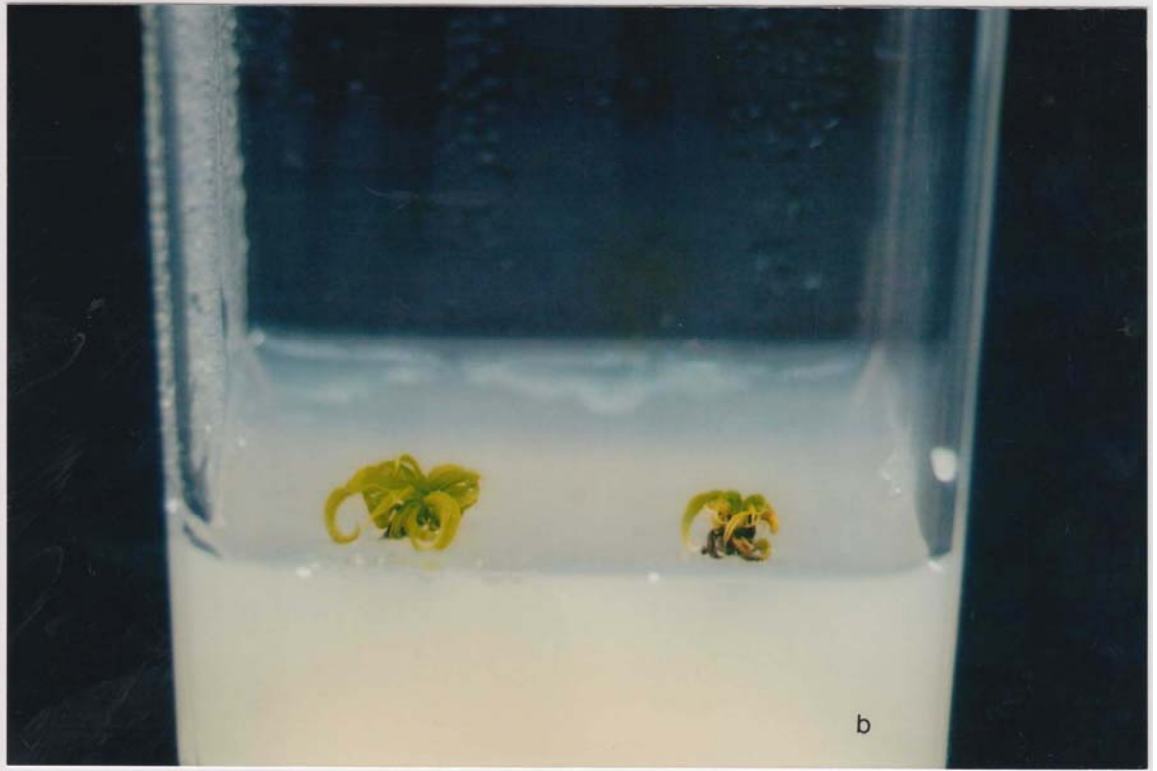
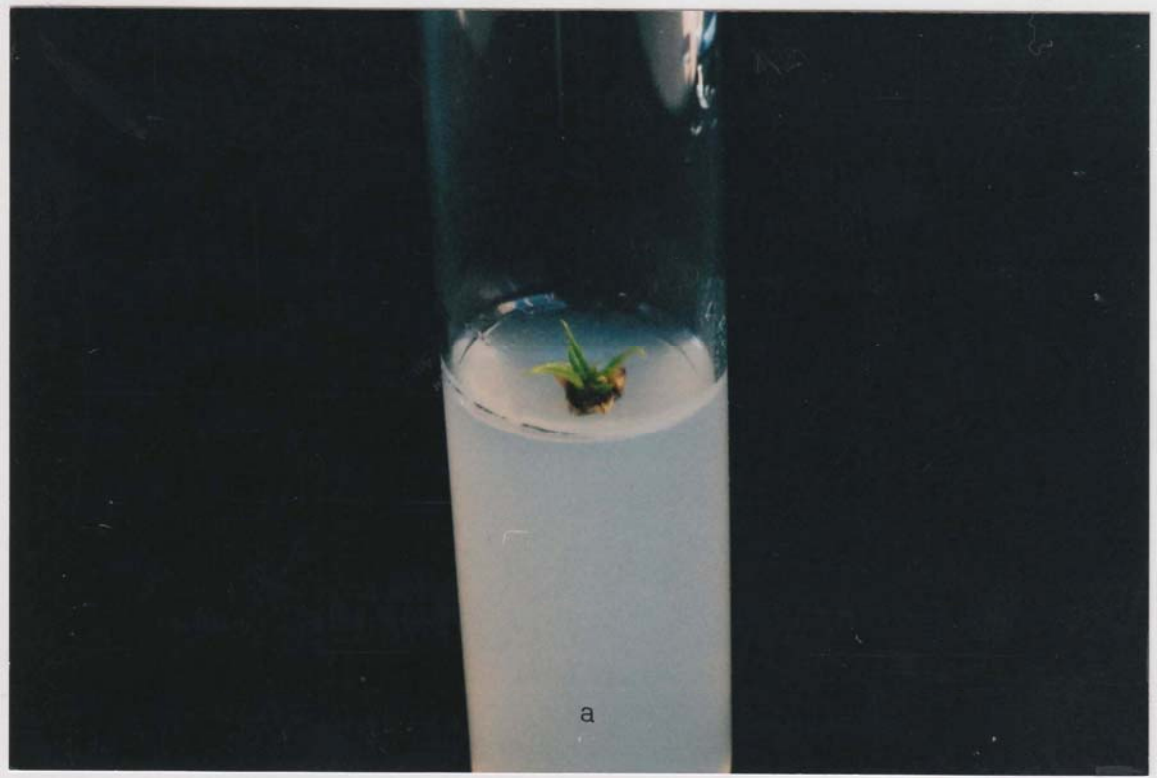
4.2.2. Ürün Veren Badem Ağaçlarından Alınan Lateral Tomurcukların *in vitro* Koşullarda Mikroçoğaltılması

Lateral tomurcuklar, materyal ve metotta belirtildiği gibi 0.5 - 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında kültüre alındıktan sonra, ilk on gün içerisinde hacimlerinde artış ile birlikte açılma görüldü (Resim:20a). Hacim artışı ve açılma görülmeyen tomurcukların ise zamanla karardığı tespit edildi. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra lateral tomurcukların 0.5 - 1.0 cm uzunluğunda olan ve 2-4 yapraklı tek sürgünlü fidecikler oluşturduğu belirlendi. 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların 0.5 mg l⁻¹ BAP'lı ortama göre daha hızlı geliştiği tespit edilerek, gelişen sürgünler 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamına alt kültüre alındı.

Alt kültüre alındıktan sonra küçük fidelerde yaklaşık 1.0-1.5 cm kadar boy uzaması ile birlikte yaprak sayısının arttığı ve yapraklarda irileşme olduğu tespit edildi (Resim:20b,c). 4 haftalık zaman periyodu sonunda her bir materyalin 1-3 adet sürgün oluşturduğu belirlendi. Oluşan yeni sürgünler çoğaltılma amacı ile kendi besi ortamlarında alt kültüre alındı (Resim:21).

2. ve 3. alt kültür işlemleri sonrasında, 1.5 - 4.5 cm uzunluğunda, 2-4 noda sahip, internodları kısa olan ve çok sayıda yaprağı bulunan sürgünler oluştu. Yeni oluşan yaprakların koyu yeşil ve morfolojik olarak doğal ortamda yetişen badem yapraklarına benzediği görüldü.

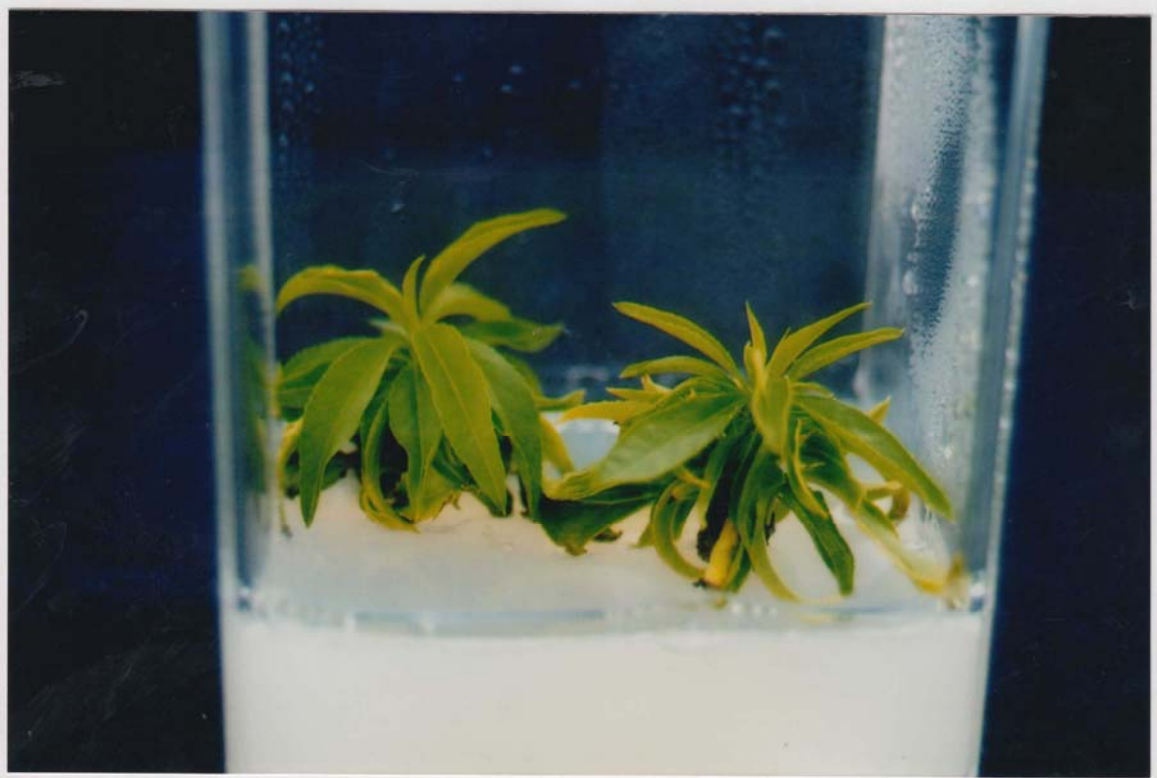
Sonuç olarak, kültürü yapılan lateral tomurcuklardan itibaren 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında, 4 alt kültürden sonra başlangıç materyal sayısı, 2-2.5 katına çıkarılarak çok sayıda köklendirmeye elverişli sürgün elde edildi (Resim:22a,b).



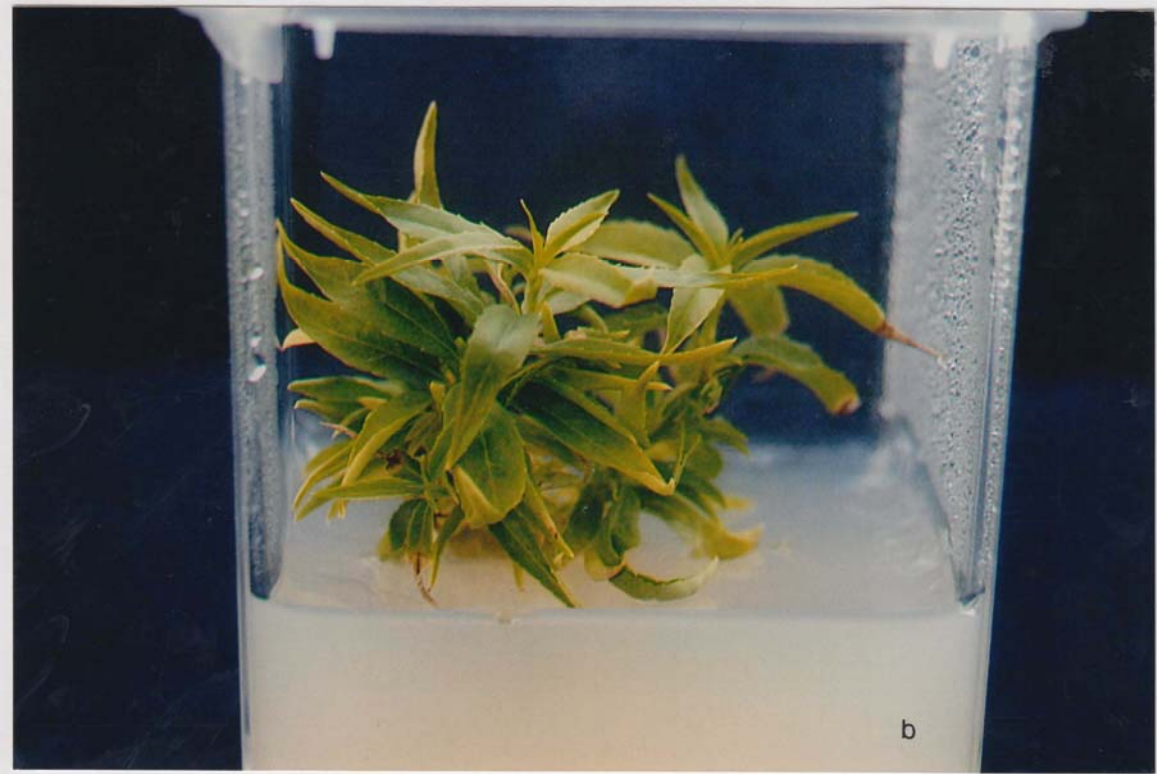
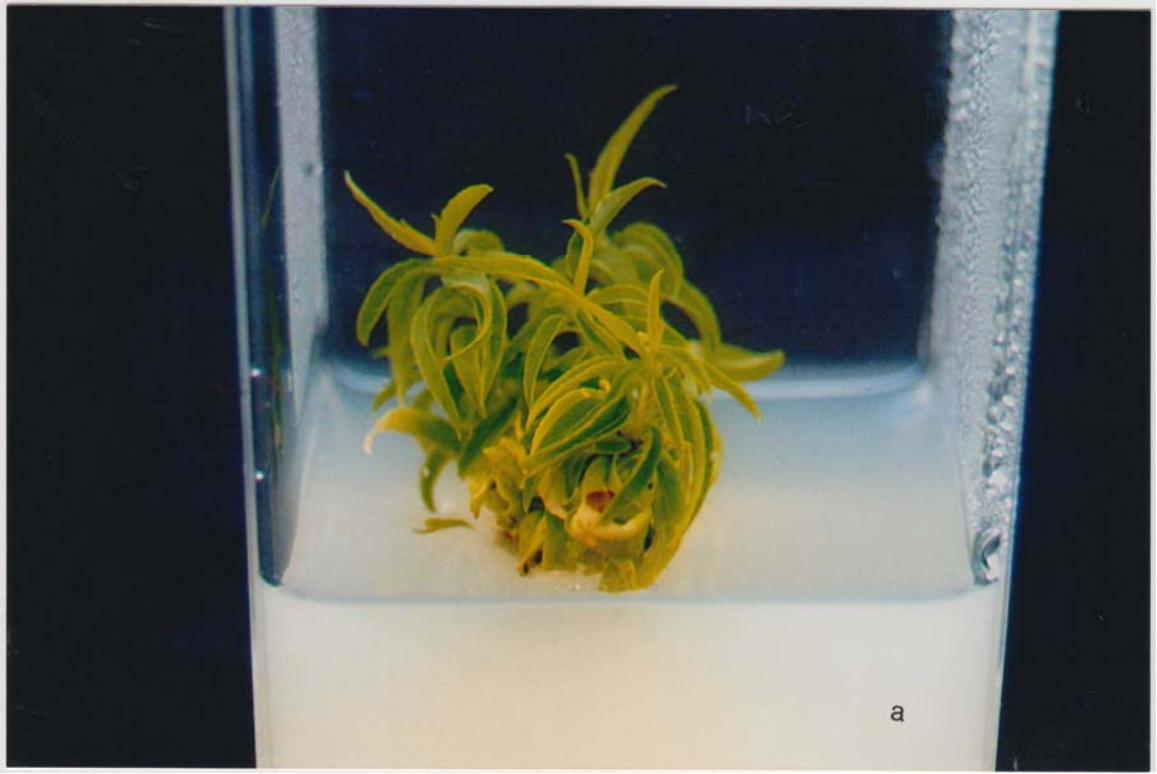
Resim 20. 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların **a.** 10 günlük **b.** 1. alt kültüre alındıktan sonraki genel görünüşü. X 1.728



Resim 20. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların c. 1. alt kültürden 4 hafta sonraki genel görünüşü. X 1.084



Resim 21. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında 2. alt kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü. X 1.706



Resim 22. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların **a.** 3. alt kültür **b.** 4. alt kültür sonrası genel görünüşü. X 1.661, X 1.644

4.3. Nonpareil Çiçek Tomurcuklarından Kallus Oluşturma Çalışmaları

Kültüre alınan çiçek tomurcuklarında meydana gelen morfolojik değişiklikler ve gelişmeler aşağıda verildiği gibi gözlemlendi.

Tablo. 10. Nonpareil çiçek tomurcuklarından itibaren kallus oluşturma

İşlemler	Kallus (%)	Kallusun şekli	Organogenesis
Kontrol	0	-	0
2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	40	Yeşil, sert tekstürlü, homojen	0
4.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	0	-	0
6.0 mg l ⁻¹ 2,4-D	0	-	0
2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D+ 1 mg l ⁻¹ NAA	30	Açık yeşil, sert tekstürlü, taneli	0
2.0 mg/l 2,4-D+ 1mg/l IAA	10	Açık sarı, yumuşak tekstürlü	0

Rakamlar kültürün 60. gününde toplam 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir

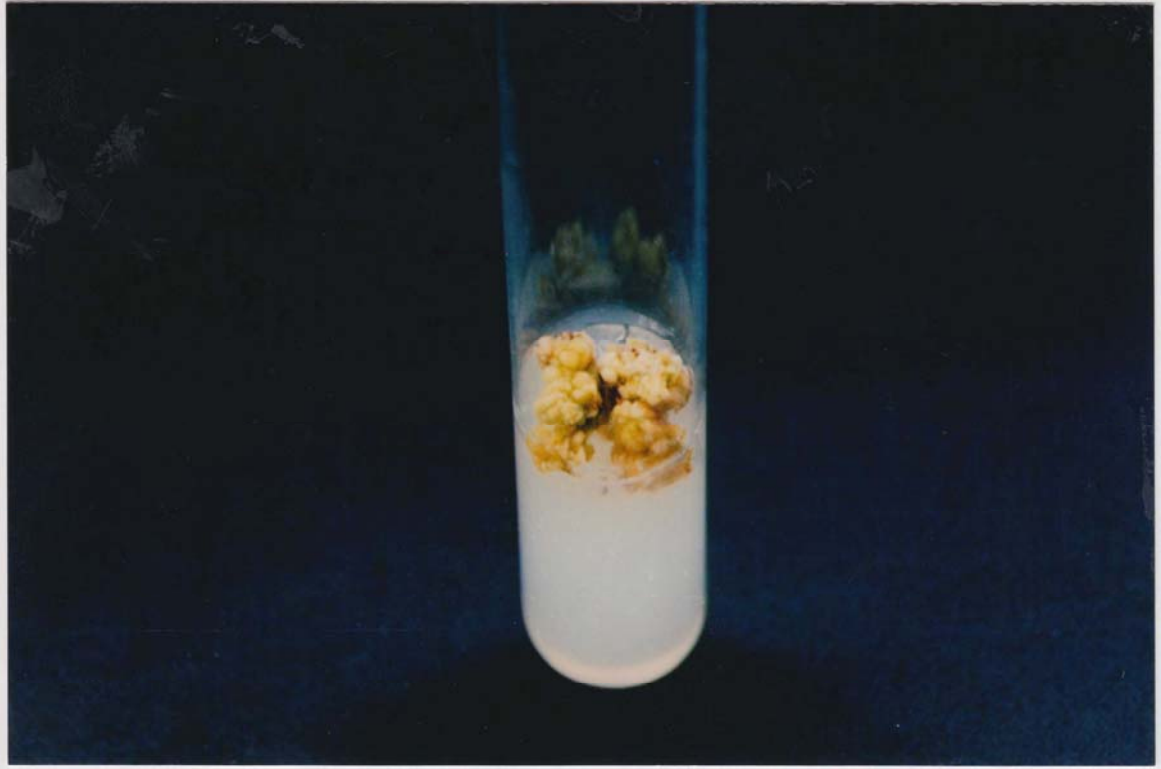
Kültürün yedinci gününde, test edilen 2,4-D oranları arasında 2.0 mg l⁻¹ konsantrasyonunda kültüre alınan çiçek tomurcuklarının büyük çoğunluğunda hacim artışı görülmesine karşın, diğer iki oranda (4.0-6.0 mg l⁻¹) ise herhangi bir gelişim belirtisi görülmedi.

2.0 mg l⁻¹ 2,4-D'ye IAA ve NAA (1.0 mg l⁻¹) ilave edilerek hazırlanan besi ortamlarında kültüre alınan çiçek tomurcuklarının gelişimi, diğer oranlara göre daha iyiydi. Materyallerin hemen hemen tamamında fark edilir bir şekilde hacim artışına tanık olundu. Kontrol grubunda ise, çiçek tomurcuklarının 2 tanesinde kararma görülürken ancak 2 tanesinde hacim artışı olduğu saptandı.

Kültürün otuzuncu gününde ise, kontrol grubundaki tomurcukların hemen hepsinde kararma ile birlikte kallus oluşumu da görülmediğinden, kültürden çıkarıldı.

Çiçek tomurcukları kültüre alındıktan üç ay sonra materyallerin bir kısmında herhangi bir kallus gelişimi görülmediğinden ve kararmaya gittiğinden, kültürden çıkarıldılar (6-4 mg l⁻¹ 2,4-D).

2 mg l⁻¹ 2,4-D'li besi ortamında ise, 4 materyalde yoğun kallus oluşumuna tanık olundu. Oluşan kallus yeşilimsi ve sert tekstürlüydü. Geriye kalan tomurcukların gelişmesi sadece hacim artışı ile sınırlı kaldı ve karardı.



Resim 23. 1.0 mg l^{-1} NAA + 2.0 mg l^{-1} 2.4-D içeren MS besi ortamında kültüre alınan çiçek tomurcuklarında kallus oluşumu



Resim 24. Çiçek tomurcuklarından oluşan kallusun aynı besi ortamına alt kültüre alındıktan sonraki genel görünümü. X 1.677

Bunun yanında 2 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} IAA içeren besi ortamında çiçek tomurcukları az miktarda kallus oluşturdu. 1 mg l^{-1} NAA + 2 mg l^{-1} 2,4-D'nin bulunduğu besi ortamındaki çiçek tomurcuklarının 3 tanesinde çok yoğun kallus oluştu. Açık sarı ve yeşil renkte, materyali örtecek şekilde yoğunlaşan kallus sert tekstürlü ve küçük tomurcuklar halindeydi (Resim:23). Uzun süre kültürde tutulan materyallerin birinci alt kültürü aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

Çiçek tomurcuklarından elde edilen kallusların bir kısmı, en yoğun kallus gelişiminin olduğu 1 mg l^{-1} NAA + 2 mg l^{-1} 2,4-D içeren besi ortamına, diğer bir kısmı ise organogenesisi başlatmak amacı ile 2 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamına aktarıldı.

Alt kültüre alındıktan on beş gün sonra, 2 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamında yeni kallus oluşumuna tanık olunmazken, 1 mg l^{-1} NAA + 2 mg l^{-1} 2,4-D'li besi ortamında ise, yoğun kallus oluşumu devam etti (Resim:24).

Kültürün otuzuncu gününde ise, 2 mg l^{-1} BAP'lı ortamdaki materyallerin tamamının karardığı ve organogenesis faaliyetine rastlanmadığından kültürden çıkarıldı.

Kültürün otuz beşinci gününde 1 mg l^{-1} NAA + 2 mg l^{-1} 2,4-D'li besi ortamında gelişen kallusun ikinci alt kültürü yapıldı. MS besi ortamına 2 mg l^{-1} NAA + 4 mg l^{-1} 2,4-D ilave edildi. On beş gün sonra kültürün 1/3'ünde, sert tekstürlü, koyu yeşil ve taneli kallus gelişimine tanık olundu. Kültürün geri kalanında ise kallus oluşumunun daha az olduğu görüldü. Uzun süre kültürde muhafaza edilen materyallerden kallus oluşumu dışında bitki rejenerasyonu ve organogenezisi görülmedi.

4.4. Köklendirme Çalışmaları

4.4.1. Badem Sürgünlerinin *In Vitro* Şartlarda Köklendirilmesine IAA ve NAA' in Etkisi

In vitro şartlarda elde edilen sürgünler, köklendirilme amacı ile **Bölüm.3.2.7.4.1**.de belirtildiği gibi hazırlanan MS besi ortamında kültüre alındı.

Kültürün yirminci gününden itibaren sürgünlerin yapraklarında hafif sararma ve kahverengileşme görüldü. Bunun yanı sıra sürgünlerin taban kısmında kahverengi nekroz benzeri yapılara da tanık olundu. Kültürde 40 gün muhafaza edilen sürgünlerin hiçbirinde kök oluşumu görülmediği gibi, bitkiciklerin yavaş yavaş sararıp kuruduğu tespit edildi.

4.4.2. Sürgünlerin *In Vitro* Şartlarda Köklendirilmesinde Işığın Etkisi

Köklendirmede ışığın etkisini test etmek için, sürgünler **Bölüm.3.2.7.4.2** belirtildiği gibi hazırlanan MS besi ortamına aktarıldı. 10 gün boyunca karanlıkta bırakılan kültürün

yarısının folyoları tamamen açılarak aydınlık ortama bırakıldı. Diğer yarısının ise sadece besi yeri kapalı kalacak şekilde yarım açıldı ve 17 gün sonra tamamen açılmak üzere folyoları çıkarıldı.

Sürgünler, önceki deneye göre daha erken safhada sararmaya ve solmaya başladı. Kontrol grubu da dahil olmak üzere, sürgünler 40 gün boyunca kültür ortamında muhafaza edilmesine rağmen kök oluşumu görülmedi.

4.4.3. Sürgünlerin *İn Vitro* Köklendirilmesinde WPM'un etkisi

Farklı yoğunlukta hazırlanan WPM besi ortamı 2 mg l^{-1} NAA ile desteklenerek sürgünlerin ekim işlemleri yapıldı.

Kültürün onuncu gününden itibaren 1/4 oranında sulandırılmış WPM besi ortamına köklenmeye bırakılan sürgünlerin sararmaya ve solmaya başladığına tanık olundu. Diğer oranlarda (1/1 - 1/2 - 2/1 WPM) ise, yeni yaprak oluşumunun yanı sıra sararma yavaş ve çok az miktardaydı. 45 gün boyunca kültürde muhafaza edilen sürgünlerin hiçbirinde köklenme görülmedi.

4.4.4. Sürgünlerin *İn Vitro* Köklendirilmesinde IAA'in Yüksek konsantrasyonlarının Etkisi

Besi ortamının hazırlanışı ve ekim işlemleri materyal ve metot bölümünde verildiği gibi uygulandı. Kültürün beşinci gününde, 8 mg l^{-1} IAA' in bulunduğu besi ortamında köklenmeye bırakılan sürgünlerden sadece 1 materyalde kök oluşumu belirtisine tanık olundu. Bu yapı, materyalin taban kısmında beyaz küçük bir kabartı şeklindeydi. IAA'in diğer oranlarında ve kontrol grubunda ise köklenme belirtisi görülmedi.

Kültürün on dokuzuncu gününde ise, 8 mg l^{-1} IAA içeren besi ortamında, 2 materyalde 1-2 adet 0.1 - 0.3 cm uzunluğunda kalın kök oluştuğu görüldü. IAA'in diğer oranlarında ise kök oluşumu görülmediği gibi 12 mg l^{-1} IAA bulunan temel besi ortamında bulunan sürgünlerin sarardığı tespit edildi. Bunun yanında, 10 mg l^{-1} IAA bulunan temel besi ortamındaki sürgünlerde ise sararmanın daha az olduğu gözlemlendi.

Kültürün yirmi sekizinci gününde ise, 8 mg l^{-1} IAA bulunan temel besi ortamında, 6 materyalin morfolojik olarak gelişimine devam ettiğine ve yeni yaprak oluşumuna tanık olunurken diğer 2 materyalde gelişimin yavaşladığı ve sararmanın olduğu görüldü.

10 mg l^{-1} IAA'te ise, 8 materyalin hiç birinde kök görülmediği gibi, 4 materyalde gelişim iyi, diğer 4 materyalde ise sürgünlerin sarardığı belirlendi. 12 mg l^{-1} IAA'in bulunduğu temel besi ortamında ise, sürgünlerin gelişimi ve yaprak oluşumu çok yavaş, sararma diğer

oranlara göre daha fazlaydı. Hormon içermeyen temel besi ortamında ise, bitkiciklerin gelişimi iyi ve renkleri canlı-yeşildi.

Kültüre alındıktan kırk gün sonra, 8 mg l⁻¹ IAA bulunan MS besi ortamında köklenmeye bırakılan 8 materyalden 4'ünde uzun primer kökün yanı sıra çok sayıda sekonder kök oluşumuna da tanık olundu. Birinci materyalde 2 cm uzunluğunda kalın primer kök, ikinci materyalde, 4-6 cm uzunluğunda 3 adet primer kök ile çok sayıda sekonder kök, üçüncü materyalde ise 2 adet kalın primer kök (5-7 cm) ile birlikte sekonder kökler görüldü. Dördüncü materyalde oluşan kök uzunluğu 0.4 cm idi.

Sürgünlerin genel görünümüne bakıldığında, kök oluşturmuş fideciklerin büyümesi devam ederken, diğer sürgünlerin (kök oluşturmayan) büyümesi iyice yavaşlayarak yapraklarının sarardığı görüldü.

Kontrol da dahil olmak üzere, IAA'in diğer oranlarında (10-12 mg l⁻¹) ise kök oluşumuna rastlanmadı. 10-12 mg l⁻¹ IAA içeren köklendirme besi ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde, yapraklar sarardığı gibi, gelişmenin de olmadığı görüldü. Hormon içermeyen besi ortamlarında bulunan sürgünlerde ise, yaprakların rengi canlı-yeşil ve büyümenin çok az da olsa devam ettiği belirlendi.

Sonuç olarak, 8.0 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş 1/2 MS besi ortamında *in vitro* koşullarda kültüre alınan sürgünlerin %50'sinde primer ve sekonder kökler elde edildi (Resim:25a,b). Test edilen diğer IAA oranlarında ve kontrol grubundaki sürgünlerde ise kök oluşumu belirlenemedi.



Resim 25a.b. 8 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş 1/2 MS besi ortamında köklendirilen fideler. X 0.864, x 0.830

4.5. *İn Vitro* Koşullarda Elde Edilen Badem (*Amygdalus communis*. L.cv. Nonpareil) Fidelerinin Toprağa Adaptasyonu

İn vitro ortamda elde edilen köklü fidelerden 6 tanesinin toprağa adaptasyonu aşamalı olarak aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

-*İn vitro* koşullarda kök oluşturan fideler kültür kaplarından çıkarılıp musluk suyunda iyice yıkanarak jelozdan arındırıldı.

-Turbiyer toprağın bulunduğu saksılar bolca sulandı ve köklü fideler, hazırlanan bu saksılara ekildi. Hava almayacak şekilde saksıların üzeri plastik torbalar ile kapatıldı.

-Saksılara ekimi yapılan fideler, 16/8 fotoperiyoda 25 ± 2 °C'deki kültür odasında gelişmeye bırakıldı.

-2.gün saksıların üzerini örten plastik torbalarda küçük delikler açıldı. Bu sayı 6.güne kadar aşamalı olarak artırıldı.

-6.gün saksıların üzerindeki plastik torbalar 5 dakika süre ile komple çıkarıldı. Toprağa adaptasyonu sağlanmak istenen fidelerden, 2 tanesinde enfeksiyon görüldüğünden kültür odasından çıkarıldı. Geriye kalan fidelerin adaptasyonunda herhangi bir problem görülmeyerek, üzerindeki torbaların çıkarılma süresi 21. güne kadar kademeli olarak artırıldı.

-21.gün plastik torbalar tamamen çıkarıldı ve 4 adet saksı ekvator odasında büyümeye bırakıldı (Resim:26).

-Ekvator odasında yaklaşık bir ay kadar muhafaza edilen fidelerin 2-4 cm kadar uzadığı ve yeni yaprak gelişimi ile toprağa adaptasyonu sağlanmış oldu.

-Toprağa ve dış ortama adapte olan 4 adet bitkinin arazi koşullarına dikimi yapılarak, gelişmesi gözlem altına alındı (Resim:27).



Resim 26. Doğal Şartlara adapte olmuş Nonpareil fidelerinin görünüşü



Resim 27. Toprağa adaptasyonu yapılan bir fidenin arazi koşullarına aktarılmış hali.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada, juvenil ve yaşlı dokular kullanılarak, Nonpareil badem çeşidi için uygun sterilizasyon ve *in vitro* çoğaltma tekniği geliştirildi.

Virüs ile bulaşık ürün veren ağaçlardan alınan materyallerin kültüre alınması için öncelikle **Bölüm. 2.2.2.** de anlatılan metodlardan birini veya birkaçını uygulamak gerekmektedir. Odunsu ağaçlara bu yöntemleri uygulamak ve virüzsüs materyal elde etmek oldukça zor ve çok uzun bir zamanı almaktadır.

Virüsten arı stokları üretmek için, virüs ile bulaşık olmayan tohumlar, kök stokları olarak kullanılmaktadır (**Babaoğlu, Gürel, Özcan, 2002**). Bu görüşten yola çıkarak, tohumdan (zigotik embriyo) seri ve hızlı bir şekilde çoğaltılan badem sürgünleri, mikro aşılama çalışmalarında sağlıklı anaç (kök stokları) olarak kullanmak üzere metod geliştirilmiş olundu.

Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarından izole edilen zigotik embriyoların mikroçoğaltma çalışmalarında, kültür başlatılması ve proliferasyon aşamasında en iyi sonuç 1.0 mg l^{-1} BAP bulunan besi ortamında elde edildi. Her iki aşamada da en iyi sonucu 1.0 mg l^{-1} BAP verdiği için, yaşlı dokuların mikroçoğaltılmasında bu hormon miktarının kullanılmasına referans oldu. Bu bilgiler doğrultusunda yaşlı dokulardan itibaren bitki rejenerasyonu için 1.0 mg l^{-1} BAP kullanıldı. Alınan sonuçlar benzerlik arz ettiğinden, zigotik embriyolar için kullanılan yöntemlerin yaşlı dokular için de uygulanabilirliği tespit edildi.

Tabachnick ve Kester (1977), modifiye ettiği MS besi ortamında badem eksplantlarının gelişebilmesi ve canlılığını devam ettirebilmesi için bir sitokinin mutlak gerekli olduğunu, proliferasyon ve çoğaltma aşamasında 1.0 mg/l BA'nın çok iyi sonuç verdiğini rapor etmiştir. Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlarda, **Tabachnick ve Kester (1977)**'in bildirdiği gibi, olgun tohumdan izole edilen zigotik embriyoların özellikle kültür başlatılması aşamasında, hormonsuz ortamda elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, besi ortamında bir sitokininin mutlak gerekli olduğunu ve eksplantların proliferasyonu için 1.0 mg l^{-1} BAP'ın en iyi sonucu verdiğini tespit ettik. **Tabachnick ve Kester** bu sonuçları %2 sakkaroz ile desteklenmiş kompleks (KNOP ve MS'in modifiye şekli) kültür besi ortamında alırken, çalışmalarda %3 sakkaroz ile desteklenmiş temel MS besi ortamında benzer sonuçları elde ettik.

Tabachnick ve Kester (1977), aynı çalışmada, 1.0 mg/l BA konsantrasyonunda sürgün uzaması inhibe olurken yan sürgün gelişimini teşvik ettiğini buna karşın BA konsantrasyonunun 0.1 mg/l 'ye düşürüldüğünde ise sürgün uzamasının baskın olduğunu ve

daha az yan sürgün oluşumu olduğunu rapor etmiştir. Yaptığımız çalışmalar **Tabachnick ve Kester**'in bildirmiş oldukları sonuçlar ile paralellik göstermektedir. BAP oranı düşürüldüğünde yan sürgün oluşumunun inhibe olduğunu ancak araştırmacıların bildirdiği sürgün boyu uzamasının baskın olmadığını tespit ettik. Ayrıca, araştırmacıların bildirmiş olduğu sürgün uzamasının test edilen kinetin konsantrasyonlarında ve hormon içermeyen kültür ortamlarında olduğunu saptadık.

Zdruikouskaya ve Richter (1972), modifeye White besi ortamını kullanarak bir badem embriyosundan sınırlı sayıda, oysa bu çalışma ile MS besi ortamında, bir badem embriyosundan çok sayıda bitki elde ettik.

Hisajima (1982) badem tohumlarını, 11 mg/l BA içeren MS besi ortamında yetiştirmiş ve oluşan sürgünleri çoğaltmak için 0.2 mg/l BA+0.005 mg/l IBA içeren MS besi ortamının en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir. **Zhuan (1980)**, badem gibi sert çekirdekli olan malta eriğinin zigotik embriyolarını kullanarak 0.2 mg/l NAA+ 3.0 mg/l BA içeren MS besi ortamında %70 apikal sürgün ve %40 oranında yan sürgün oluştuğunu rapor etmiştir.

In vitro koşullarda zigotik embriyolardan gelişen sürgünlerin proliferasyonuna sitokin yanında oksinin (NAA ve IAA) etkisi araştırıldı. Sonuç olarak sürgünlerin proliferasyonuna **Hisajima (1982)**'nin belirttiğinin aksine, 1.0 mg l⁻¹ BAP'ın tek başına kullanımının sürgün sayısı bakımından daha iyi sonuç verdiğini, oysa besi ortamına oksin ilave edildiğinde oluşan sürgün sayısında önemli bir azalma olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlara göre sürgün proliferasyonu için BAP'ın tek başına kullanımının daha ekonomik ve etkili olduğunu saptadık.

Barghchi ve Alderson (1983) sert çekirdekli meyve grubuna giren *Pistacia vera*'nın fide eksplantlarından çok sayıda sürgün üretimi için BAP'ın kinetini ortama göre daha etkili olduğunu ve 4 mg/l BAP'ın sürgün oluşumu için optimum olduğunu rapor ederken **Tricoli ve ark. (1985)** da vişnenin mikroçoğaltılmasında 1/1 MS'in ve BAP'ın en iyi sonucu verdiğini 0.75 mg/l BA bulunan besi ortamlarında kültüre alınan sürgün uçlarının en iyi sonucu verdiğini bildirmiş, 1 mg/l BA'da ise tomurcuk çoğalması artarken sürgün uzamasının azaldığını rapor etmişlerdir. **Gürel ve Gülşen (1998b)**, Nonpareil ve Texas badem çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile ilgili yaptıkları çalışmada sürgün gelişimi için hormon içermeyen veya sadece düşük düzeyde IBA içeren ortamların daha uygun olduğunu, çoğaltma aşamasında ise 0.1 mg/l IBA ile 1 mg/l BAP kombinasyonu sürgün verimi ve gelişmesi bakımından en iyi sonuçları verdiğini bildirmişlerdir. Aynı

araştırmacılar gerek kültürün başlatılmasında gerekse çoğaltma aşamasında sürgün oluşumu için BAP'ın mutlak gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Nonpareil badem çeşidinin sürgün ucu ve lateral tomurcuklarının *in vitro* çoğaltılması için yapılan kültür başlatılması ve proliferasyon aşamalarında, bitki rejenerasyonu 1 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında elde edildi. Yaptığımız çalışmalarla **Gürel ve Gülşen**'in rapor ettiği gibi kültür başlatma ve proliferasyon aşamalarında BAP'ın mutlak gerekli olduğu belirlendi.

Rugini ve Verma (1982, 1983), bademin Ferragnes kültür varyetesinin tepe tomurcuklarını 0.5 mg/l BA +0.1 mg/l IBA içeren kültür başlatma besi ortamında tek bir sürgün geliştiğini bildirmişlerdir. Yapılan alt kültürler ile sürgünlerin 6 kat arttığını ve proliferasyon ortamında düşük sitokin ve eser miktarda NAA bulunmasının gerekli olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmada, lateral tomurcukların kültür başlatılması aşamasında, 1 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında sadece tek bir sürgün oluşturduğunu ve yapılan alt kültürlerle sürgün sayısının 2 - 2.5 katına çıktığını tespit ettik.

Maynard ve ark. (1991), vişne sürgünlerinin alt kültürünün 4-6 haftada bir yapılması gerektiğini, alt kültür geciktiğinde ise gelişen sürgünlerin yapraklarında sararma, sürgün ucu nekrozu ve besi ortamına fenolik bileşiklerin salındığını bildirmiştir.

Vişne gibi sert çekirdekli bir meyve türü olan Nonpareil badem çeşidinin sürgün ucu ve lateral tomurcuklarının *in vitro* kültür çalışmalarında, mutlak suretle 4 haftada bir alt kültür yapılması gerektiğini, alt kültür geciktiğinde ise araştırmacıların belirttiği gibi istenmeyen durumların meydana geldiğini belirledik.

Hartmann ve ark. (1990), badem sürgünlerinin *in vitro* şartlarda köklendirilmesinin oldukça zor olduğunu ve başarının sınırlı olduğunu rapor etmişlerdir. **Tabachnick ve Kester (1977)** bademin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında, IBA, NAA ve oksin içermeyen kültür besi ortamlarında sınırlı sayıda kök elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kester ve Sartori (1966), badem X şeftali hibridi klonlarının köklenmesinin kolay olduğunu bildirmişlerdir.

Nemeth (1979), ışıklı ortamda badem X şeftali hibridi sürgünlerini köklenme ortamına almışlar ve kültürün %71'inde, her sürgünde 2 tane kök olmak üzere 1 mg/l IBA'ın en iyi sonucu verdiğini rapor etmiştir.

Rugini ve verma (1982,1983), bademin Ferragnes kültür varyetesinin sürgünlerini köklenme amacı ile kültüre almışlar ve sürgünlerin %55'inin köklendiğini rapor etmişlerdir.

Caboni ve Damiano (1994), iki farklı badem genotipinin çeliklerini *in vitro* ortamda kültüre alarak karanlığın ve oksinin (IAA, IBA) köklenmeye etkisini araştırmışlar. Sonuçta çeliklerin köklenmesinde IAA ve IBA'in etkisinin badem genotipine göre değiştiğini rapor etmişlerdir.

Ainsley ve ark. (2001), *in vitro* şartlarda Ne Plus Ultra ve Nonpareil badem çeşitlerinin sürgünlerini köklendirmede en uygun oksin çeşidi ve oranını tespit etmek için IBA ve NAA'ı kullanmışlar. Her iki çeşitte de en iyi köklenmenin 1.0 mM IBA içeren %0.6 sıvı agarda 12 saat muamele edildikten sonra 100.0 µM PG içeren oksinsiz besi ortamında 2 hafta bekletilmek suretiyle elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca tam güçteki AP (Almehdi ve Parfitt,1986) besi ortamının Nonpareil'de en iyi köklenme sonucunu verdiğini ve ışığın köklenmeye etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, Nonpareil badem çeşidinin *in vitro* şartlarda köklendirilme çalışmalarında IAA ve NAA'in farklı oranları hem ışıklı hem de karanlık ortamda test edilerek sonuç alınamadı. Ayrıca IAA'in 8.0 - 10.0 - 12.0 mg l⁻¹ lik oranlarının bulunduğu 1/2 MS besi ortamı kullanıldı. Sonuç olarak 8.0 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş 1/2 MS besi ortamında *in vitro* koşullarda kültüre alınan sürgünlerin %50'sinde primer ve sekonder kök oluşumu saptandı.

6. KAYNAKLAR

ADİYAMAN, F., 1998. *Vitis vinifera* L.cv. Perle de Csaba'nın gövdelerinin, çiçek durumlarının ve lateral tomurcuklarının proliferasyon kapasitelerinin, yılın değişik zamanlarına göre in vitro şartlarda karşılaştırılması araştırmaları. Yüksek Lisans Tezi. D.Ü.F.B.E. Diyarbakır.

AINSLEY, P.J., COLLINS, G.G., SEDGLEY, M., 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill), In vitro Cellular&Developmental Biology-Plant, 36 (6): 470-474.

AINSLEY, P.J., HAMMERSCHLAG, F.A., BERTOZZI, T., COLLINS, G.G., SEDGLEY, M., 2001. Regeneration of almond from immature seed cotyledons, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 67 (3): 221-226.

AINSLEY, P.J., COLLINS, G.G., SEDGLEY, M., 2001. In vitro rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill), In vitro Cellular&Developmental Biology-Plant, 37 (6): 778-785.

ANONYMOUS, 1984. Tarımsal Yapı ve Üretim. DİE Yayınları, Ankara.

ARDA, M., 1995. Bitkilerde Biyoteknoloji. Biyoteknoloji ders kitabı. KÜKEM Derneği bilimsel yayınları No:3, Ankara.

BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., 2002. Bitki biyoteknolojisi-1, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı yayınları, Konya.

BARGHCHI, M., ALDERSON, P.G., 1983. In vitro propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. I. Hortic. Sci. 58:435-445.

BARGHCHI, M., ALDERSON, P.G., 1985. In vitro propagation of *Pistacia vera* L. and the commercial cultivars ohadi and kalleghochi. Journal of Horticultural Science , 60 (3):423-430.

BARGHCHI, M., 1985a. In vitro culture of mature commercia *Pistacia vera* L. cultivars. Proc. Inter. Plant Prop's, soc., 35:331-333.

BARGHCHI, M., 1985b. In vitro micropropagation of *Pistacia* rootstocks. Proc. Inter. Plant Prop's Soc., 35:334-337.

BAŞARAN, D., 1980. *Nicotiana tabacum L.cv.* Siirt'in pistil ve stamenlerinden in vitro olarak embriyo elde edilmesi araştırmaları. TBTAK VII. Bilim Kongresi Ankara.

BAŞARAN, D., 1990. Bitki Doku Kùltürleri Ders Kitabı. Dicle üniversitesi Fen Edebiyat Fakùltesi Yayınları, Yayın No:14.Diyarbakır.

BAŞARAN, D., ÇOLAK, G., NAMLI, O., YÜCEL, S., 1991. Rechershes sur l'obtention des plantes diploides en in vitro a partir des pistils de *Nicotiana rustica L.* Plant Biotechnology, Acta Horticulturae 289, 215-216.

BEYAZOĞLU, O., DURAL, H., 1991. Determination of the fatty acids from the seeds of some *Amygdalus* species. Doğa- Tr.J. of Biology, 15, 206-209.

BOXUS, P., DRUART, P., 1986. Virus-free trees through tissue culture. In :Bajaj YPS (ed) biotechnology in agriculture and forestry, vol I: Trees I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 24-30.

BUTTON, J., BORNMAN, C.H., 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington Navel in vitro. Journal of South African Botani 37, 127-133.

CABONI, E., DAMIANO, C., 1994. Rooting in two almond genotypes. Plant Science 96:163-165.

COFFIN, R., TAPER, C.D., CHONG, C., 1976. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosacea. Can J Bot 54:547-551.

ÇOLAK, G., 1994. Biyoteknolojik yöntemlerle *Impatiens walleriana* var. Sultanii ve *Nicotiana rustica L* gövdelerinin mikropropagasyonu, *Nicotiana rustica L* pistillerinden çiçek, anterlerinden n ve 2n kromozumlu homozigot diploid bitkiler oluşturulması araştırmaları. D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. Diyarbakır.

D'AMATO, F., 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. Plant-Cell, Tissue and Organ Culture, 343-357.

DEBERGH, P., ROGGEMANS, J., METSENAERE, RS., 1990. Tissue culture in relation to ornamental plants. In: Bhojwani ss (ed), plant tissue culture: applications and limitations, volume 19, chapter 7, pp 161-190, The Netherlands.

DOKUZOĞUZ, M., GÜLCAN, R., 1979. Badem yetiştiriciliği ve sorunları. Tübitak Yayınları, No: 432, Toag Seri no 90, Ankara, 80 s

FEUCHT, W., DAUSEND, D., 1976. Root induction in vitro of easy –to- root *Prunus pseudocerasus* and difficult- to-root *Prunus avium*. Scientia Horticulturae 4, 49-54.

GAUTHERET, R.J., 1959. La Culture des tissus vegetaux, 1 vol, masson Ed. Paris, 863 pp

GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture, excenetics Ltd. New York, 577-585.

GEORGE, EF., 1993. Plant propagation by tissue culture, part 1, The Technology. Exegetic Ltd. Edington, Wilts, England.

GÜREL, S., GÜLŞEN, Y., 1998a. The effects of different sucrose, agar and pH levels on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. oF Botany, 22, 363-373.

GÜREL, S., GÜLŞEN, Y., 1998b. The effects of IBA and BAP on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. oF Botany, 22, 375-379.

HALL, S.K., 1987. Initiation of callus and shoot production in *Prunus serotina* Ehrh MS Thesis, SUNY Coll Environ Sci. For, Syracuse, NY

HANSMAN, D., NOVOA, C.O., 1986. Micropropagation of temperate Nut Trees. Horticultural Abstracts. Vol:56 (6), 409-411.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.D., 1990. Propagation methods and rootstock for the important fruit and nut species, in: H.T.Hartmann, D.E. Kester and F.D. Davies (Eds.), *Plant Propagation, Principles and Practices*, 5th Edition. Prentice-Hall Inc., Englewood, N.J., pp.527-565.

HATİPOĞLU, R., 1997. Bitki biyoteknolojisinin tarihsel gelişimi. Bitki biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No:190/9-11.

HISAJIMA, S., 1982. Multiple shoot formation from almond seeds and an excised single shoot. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1091-1093.

HO, WZ., 1983. The studies on induction of somatic embryogenesis from loquat young embryo and shoot tip. *Hortic China* 29 (4): 322.

ISHIGURO, K., YAMAMOTO, R., OKU, H., 1999. Patulosid A and B, Novel Xanthones Glycosides from Cell Suspension Cultures of *Hypericum patulum*, *J. Natural Products*, 62, 906-908.

İŞİKALAN, Ç., 1997. *Vitis vinifera* L.cv. Alphonse'un gövdelerinin, çiçek durumlarının ve lateral tomurcuklarının proliferasyon kapasitelerinin, yılın değişik zamanlarına göre in vitro şartlarda karşılaştırılması araştırmaları. Yüksek lisans tezi. D.Ü.F.B.E. Diyarbakır.

İŞİKALAN, Ç., ADIYAMAN, F., BAŞARAN, D., 1998. The Comparison studies on the proliferation of lateral buds of *Vitis vinifera* L.cv. Alphonse during different periods of the year at in vitro conditions. *Biochemical Archives international J. for Rapid Publication of Communications in Pure and Applied Biochemistry*, 14, pp 319-325.

KARTNIG, T., GOBEL, I., HEYDEL, B., 1996. Production of Hypericin, Pseudohypericin and Flavonoids in Cell Cultures of Various *Hypericum* Species and Their Chemotypes, *Planta Med.*, 62, 51-53.

KAŞKA, N., KÜDEN, A.B., KÜDEN, A., 1992. Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Seçilmiş Badem Tiplerinin Adana Ekolojik Koşullarına Adaptasyonları. *Doğa- Tr. J. Of Agricultural and Forestry* 17:97-109.

KAŞKA, N., KÜDEN, A., KÜDEN, A.B., DÜNDAR, Ö., 1993. GAP Bölgesi'ne Uyabilecek Şeftali, Kayısı, Badem ve Nektarin Çeşitlerinin Saptanması Üzerinde Çalışmalar. Ç.Ü.Z.F. (DPT Projesi).

KESTER, D.E., SARTORI, E., 1966. Rooting of cuttings in populations of peach (*Prunus persica* L.), almond (*Prunus amygdalus*. Batsch) and their hybrid proceedings of the American Society for Horticultural Science 88, 219-223.

KESTER, D.E., TABACHNIK, L., NEGUEROLES, J., 1977. Use of micropropagation and tissue culture to investigate genetic disorders in almond cultivar. Acta. Horticulturae 78, 95-101.

KÜDEN, A., KÜDEN, A.B., KAŞKA, N., AĞAR, İ.T., 1997. GAP Bölgesi'ne Adapte Edilebilecek Şeftali, Kayısı, Badem ve Erik Çeşitlerinin Saptanması II. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi. Genel yayın: No:198. GAP Yayınları No:113, Adana.

KÜDEN, A.B., KÜDEN, A., 2000. Badem yetiştiriciliği. Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi yayınları, Adana.

MARTINELLI, A., 1988. Use of in vitro techniques for selection and cloning of different *pistacia* species, Acta Horticulturae., 227, pp2.

MAYNARD, C., KAVANAGH, K., FUERNKRANZ, H., DREW, A.P., 1991. Black Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) In :Bajaj YPS (ed) biotechnology in agriculture and forestry, vol 16: Trees III. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 3-10.

MAYNARD, CA., 1986. Population genetics of forest trees: Implications for the application of in vitro techniques. In Vitro 22: 231-233.

MC COMB, J.A., 1982. Tissue-culture propagation of fruit and nut species. In Noel, D. (Ed) Tree crops: the 3rd component. Proceedings of the fruit Australasian conference on tree and nut crops (pp. 147-163) Subiaco, perth, Western Australia: 232pp.

MEHRA, A., MEHRA, P.N., 1974. Organogenesis and plantlet formation in vitro in almond. Botanical Gazette 135, 61-73.

MIGUEL, C.M., DRUART, T., OLIVEIRA, M.M., 1996. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill) eksplants. In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant, 32 (3): 148-153.

MOSELLA, L.C., MACHEIX, J.J., 1979. Le microbouturage in vitro du pêcher (*Prunus persica* Batsch): influence de certains composés phénoliques. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des sciences, D(Sciences Naturelles), 289, 567-570.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-479.

NAMLI, S., 1995. *Vitis vinifera* L.cv. Cardinal asma çeşidinin doku ve organlarından itibaren biyoteknolojik yöntemler ile mikroçoğaltma araştırmaları. Doktora tezi. D.Ü.F.B.E. Diyarbakır.

NAMLI, S., TAŞKIN, T., BAŞARAN, D., (1999). The formation of partenocarpic grapes in in vitro conditions from flowers of *Vitis vinifera* L.cv. Cardinal. Biochemical Archives international J. for Rapid Publication of Communications in Pure and Applied Biochemistry. 15, pp 13-18.

NEHRA, N.S., KARTHA, K.K., 1994. Meristem and shoot tip culture: Requirements and applications. In: Vasil IK and Thorpe TA(eds), Plant Cell and Tissue Culture, pp. 37-70. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.

NEMETH, G., 1979. Benzyladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured in vitro. Zeitschrift für pflanzenphysiologie 95, 389-396.

OCHATT, S.J., POWER, J.B., 1988. An alternative approach to plant regeneration from protoplast of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Plant Sci 56:75-79.

ONAY, A., JEFFREE, C.E., YEOMAN, M.M., 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, *Pistacia vera*.L. Plant Cell Reports, 15, 192-195.

ONAY, A.,1996. In vitro organogenesis and embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera*.L. PhD Thesis, University of Edinburgh, UK.

ONAY, A., JEFFREE, C.E., YEOMAN, M.M., 1996. Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of Pistachio, *Pistacia vera*.L. Plant Cell Reports, 15: 723-726.

ONAY, A.,2000. Somatic Embryogenesis From Mature Seed Cultures of *Pistacia atlantica*. Türk J. Agric. For, 24, 465-473.

ONAY, A.,2000. Micropropagation of Pistachio from mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60,159-162.

ÖZBEK, S., 1978. Özel Meyvecilik, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 128. Ders Kitabı: 11, Adana, 485 S.

ÖZEN, H.Ç., ONAY, A., 1999. Bitki fizyolojisinde biyoteknoloji. Bitki Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi ders kitabı, Diyarbakır, 146-152.

PONTIKIS, C.A., 1984. In vitro propagation of *Pistacia terebinthus* L. Plant Propagator 30:14-15.

RIFFAUD, J.L., CORNU, D., 1981. Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de mères adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnées en forêt. Agronomie 1:633-640.

RUGINI, E., VERMA, D.C., 1982. Micropropagation and cell suspensions of a difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*. Batsch) cultivar. In: Fujiwara, A. (Ed) Plant Tissue Culture 1982. Proceedings of the 5th international congress on plant tissue and cell culture, Japan. Japanese Association for plant tissue culture (pp.741-742). Xxvi+839pp.

RUGINI, E., VERMA, D.C., 1983. Micropropagation of difficult –to-root almond (*Prunus amygdalus*. Batsch) cultivar. Plant science letters 28, 273-281.

SEÇMEN, Ö., GEMİCİ, Y., GÖRK, G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ, E., 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar serisi no:116. Ege Ü. Basımevi, Bornova-İzmir.

SHERWOOD, J.L., 1993. Applied aspects of plant regeneration. In: Dixon DA and Gonzales RA (eds), *Plant Cell Culture-A Practical Approach*, pp.135-138, Newyork.

SÖKMEN, A., JONES, B.M., ERTÜRK, M., 1999. Antimicrobial Activity Of Extracts from the Cell Cultures of Some Turkish Medicinal Plants, Phytotherapy Research 13, 355-357.

TABACHNIK, L., KESTER, D.E., 1977. Shoot culture for almond and almond- peach hybrid clones in vitro. Hortiscience 12, 545-547.

TAŞKIN, T., 1995. *Pistacia vera* L. (Antep fıstığı)'nın çeşitli doku ve organlarından doku kültürü yöntemleriyle rejenere bitkilerin elde edilmesi araştırmaları. F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ.

TAŞKIN, T., ÇOBANOĞLU, D., ÇOLAK, G., NAMLI, S., BAŞARAN, D., GASPAR, Th. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Pistacia vera* L. *Saussurea*, 27,59-65.

TAŞKIN, T., ÇOBANOĞLU, D., NAMLI, S., BAŞARAN, D., 1996. Production of regenerate seedlings with meristem culture techniques in *Pistachia vera* Lcv. Siirt. *Acta Botanica Indica*. 24, 239-243.

TRICOLI, D.M., 1983. In vitro propagation of *Prunus serotina* Ehrh. MS Thesis, SUNY Coll Environ Sci. For, Syracuse, NY.

TRICOLI, D.M., MAYNARD, CA., DREW, A.P., 1985. Tissue culture propagation of mature trees of *Prunus serotina* Ehrh. I.Establishment, multiplication and rooting in vitro. For Sci 31:201-208.

WANG, P.J., HU, C.Y., 1980. Regeneration of virus-free plants through in vitro culture in: *Advances in Biochemical Engineering*, 18, *Plant Cell Cultures II*. A Fiechter (Ed springer-Verlag, Heidelberg, 61-99).

YANG, YQ., CHEN, GL., TONG, DY., 1982. The culture of shoot tip from loquat seedlings. Plant physiol commun (2):39-40.

YANG, YQ., CHEN, GL., TONG, DY., 1983. A study on the culture of shoot tip and its multiplication of loquat. Acta Horti Sin 10(2):79-85.

YENIKEYEV, K.K., VYSOTSKY, V.A., PNOTNIKOVA, G.A., 1984. Peculiarities of in vivo and in vitro development of cherry and sweet cherry embryos isolated in early stages of embryogenesis. USSR Agric Biol 19:46-48 (in Russian).

YILMAZ, M., 1992. Bahçe bitkileri yetiştirme tekniği. Ç.Ü. Basım evi, Adana.

YÜCEL, S., ONAY, A., ÇOLAK, G., BAŞARAN, D., 1991. The researches of obtaining from *Pistacia vera* L. apical bud and nodal bud by micropropagation. *Plant Biotechnology. Acta Horticulturae*, 289: 167-168.

YÜCEL, S., ÇOLAK, G., ONAY, A., OPAK, Y., BAŞARAN, D., NAMLI, O., 1992. *Nicotiana rustica* L. (Yabani tütün) pistillerinden itibaren in vitro olarak n ve 2n kromozomlu fertler elde edilmesi araştırmaları. Doğa Tr. J. of Botany 16, 124-135.

ZDRUIKOWSKAYA-RIKHTER, A.I., 1972. [Producing plant-twins from embryo-halves in vitro.] Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada2, 62-67.

ZHUAN, FQ., 1980. The culture of loquat young embryo. Subtrop Plant Commun 2: 3-7.

7. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo.1. Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl' in etkisi.

Tablo.2. Nonpareil badem çeşidinin ürün veren ağaçlarından alınan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi

Tablo.3. Ürün veren badem ağaçlarından alınan sürgün uçlarının dekontaminasyonu üzerine NaOCl içinde optimum bekletilme süresinin tespiti

Tablo.4. Bademin ürün veren ağaçlarından alınan lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi

Tablo.5. Zigotik embriyoların *in vitro* çoğaltılmasına BAP konsantrasyonlarının etkisi.

Tablo.6. Zigotik embriyoların *in vitro* çoğaltılmasına Kinetin konsantrasyonlarının etkisi.

Tablo.7. Zigotik embriyolardan oluşan sürgünlerin proliferasyonuna BAP konsantrasyonlarının etkisi.

Tablo.8. Zigotik embriyolardan oluşan sürgünlerin proliferasyonuna IAA ve NAA'in etkisi

Tablo.9. 0.5 –1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan oluşan sürgün sayısı

Tablo. 10. Nonpareil çiçek tomurcuklarından itibaren kallus oluşturma

8. RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1. Şanlıurfa-Koruklu Tarımsal Araştırma İstasyonunda bulunan *Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil üretim alanının görünüşü.

Resim 2. *Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil bitkisinde olgun meyvenin genel görünüşü.

Resim 3. Nonpareil badem çeşidinin olgun tohumu

Resim 4. Olgun tohumdan izole edilen zigotik embriyolarının MS besi ortamına ilk ekimi.

Resim 5a, b. Lateral tomurcukların ilk ekim hali.

Resim 6a. 2.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 6b. 4.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 6c. 0.5 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 6d. 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 7. Hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 8. Kinetin içeren MS besi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan 4 hafta sonra gelişen sürgünlerin görünüşü.

Resim 9a. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 0.1 mg l⁻¹ BAP'ın etkisi.

Resim 9b. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 0.5 mg l⁻¹ BAP'ın etkisi.

Resim 9c. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 1.0 mg l⁻¹ BAP'ın etkisi.

Resim 9d. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 2.0 mg l⁻¹ BAP'ın etkisi.

Resim 10. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 1.0 mg l⁻¹ BAP + Oksinlerin etkisi.

Resim 11. 2/1 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi

Resim 12. 1/2 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi.

Resim 13. 1/4 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi.

Resim 14. 1/1 MS besi ortamının sürgün proliferasyonuna etkisi.

Resim 15. Bir nodlu materyallerin kültüre alındıktan 4 hafta sonraki genel görünüşü.

Resim 16. 1.alt kültür sonunda 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü

Resim 17. 2.alt kültür sonunda 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü

Resim 18. 2.alt kültür sonunda 0.5 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü

Resim 19. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan sürgün uçlarının **a.** 1.alt kültür **b.** 2.alt kültür **c.** 3.alt kültür sonundaki genel görünüşü

Resim 20. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların a)10 günlük, b)1. Alt kültüre alındıktan sonra, c) 1. alt kültürden 4 hafta sonraki genel görünüşü

Resim 21. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında 2. Alt kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü

Resim 22a,b. 1.0 mg l^{-1} BAP'lı MS besi ortamında kültüre alınan lateral tomurcukların 3 ve 4 alt kültür sonrası genel görünüşü

Resim 23. 1.0 mg l^{-1} NAA + 2.0 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS besi ortamında kültüre alınan çiçek tomurcuklarında kallus oluşumu

Resim 24. Çiçek tomurcuklarından oluşan kallusun aynı besi ortamına alt kültüre alındıktan sonraki genel görünümü

Resim 25a,b. 8 mg l^{-1} IAA ile desteklenmiş 1/2 MS besi ortamında köklendirilen fideler.

Resim 26. Doğal şartlara adapte olmuş Nonpareil fidelerinin görünüşü

Resim 27. Toprağa adaptasyonu yapılan bir fidenin arazi koşullarına aktarılmış hali.