

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GF-677 HİBRİT (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) MEYVE
ANACININ *IN VITRO* KOŞULLARDA KLONAL
ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Bahar KABAKÇI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07

Sunuş Tarihi: 28/01/2013

Bornova-İZMİR

2013

Bahar KABAKÇI tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**GF-677 Hibrit (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) Meyve Anacının *In Vitro* Koşullarda Klonal Çoğaltımı Üzerine Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28/01/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Aynur GÜREL	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Bülent YAĞMUR	

ÖZET**GF-677 HİBRİT (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) MEYVE ANACININ
IN VITRO KOŞULLARDA KLONAL ÇOĞALTIMI ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

KABAKÇI, Bahar

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ocak 2013, 63 sayfa

Bu tezde, GF-677 hibrit (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) meyve anacına ait sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantlarının *in vitro* koşullarda büyüme parametreleri farklı besin ortamlarında incelenmiştir.

Öncelikle başlangıç besin ortamında kültüre alınan tüm eksplantlarda, önemli bir kontaminasyon sorunu yaşanmamıştır. Sürgün ucu eksplantlarında hiç kontaminasyon görülmezken, nod ve koltukaltı tomurcuk eksplantlarında ise kontaminasyon yüzdeleri %2.2 olarak belirlenmiştir. Daha sonra sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları, gelişme göstermeleri ve sürgün vermeleri için 5 farklı Murashige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamına aktarılmışlardır. Eksplant tipleri bakımından en düşük vitrifikasyon yüzdesi ve en yüksek çoğalma katsayısı nod eksplantlarından sağlanmıştır. En düşük vitrifikasyon yüzdesi 3. altkültürde 1 mg/L Benzil Amino Pürin (BAP) + 0.1 g/L aktif karbon içeren 1 no'lu ortam (%5.2) ile 1 mg/L BAP + 0.05 g/L phloroglucinol içeren 2 no'lu ortamdan (%7.4) elde edilmiştir. Çoğalma katsayısı (5.5) bakımından en iyi sonuç ise 3. altkültürde 1 mg/L BAP + 0.05 g/L phloroglucinol içeren 2 no'lu ortamdan alınmıştır.

Köklendirme ortamlarında ise 9 farklı MS ortamı kullanılmış ve canlı sürgün yüzdesi (%), köklenen sürgün yüzdesi (%), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet) gibi parametreler incelenmiştir. Canlı sürgün yüzdesi bakımından en iyi sonuçlar, 0.5 mg/L İndol Bütirik Asid (IBA) + 0.05 g/L phloroglucinol (7 no'lu ortam) (%86.6) ve 1 mg/L IBA + 0.05 g/L phloroglucinol içeren (8 no'lu ortam) (%84.4) MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Köklenen sürgün yüzdesi bakımından en yüksek değerler, 0.5 mg/L

IBA + 0.05 g/L phloroglucinol bulunan (7 no'lu ortam) (%86.6) ve 1 mg/L IBA + 0.05 g/L phloroglucinol içeren (8 no'lu ortam) (%84.4) MS besin ortamlarında belirlenmiştir. En uzun boylu bitkicikler, 1 mg/L IBA + 0.05 g/L phloroglucinol içeren ortamdan (8 no'lu ortam) (5.8 cm); bitkicik başına düşen ortalama kök sayısına (adet) bakıldığında ise en iyi sonuçlar, 1 mg/L IBA + 0.05 gr/L phloroglucinol bulunan (8 no'lu ortam) (10.3 adet) MS besin ortamından sağlanmıştır. Tüm kültürler, floresan ışığında 4000 lux aydınlatma altında, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

Aklimatizasyon aşamasında 290 adet bitkiden 170 adeti (%58.62) başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılmışlardır.

Anahtar Sözcükler: GF-677, *Prunus amygdalus* x *P. persica*, *in vitro*, klonal çoğaltım, vitrifikasyon, sürgün oluşumu, köklenme.

ABSTRACT**RESEARCHES ON CLONAL PROPAGATION OF GF-677 HYBRID
(*Prunus amygdalus* × *P. persica*) FRUIT ROOTSTOCK IN VITRO
CONDITIONS**

KABAKÇI, Bahar

M.Sc. Thesis in Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

January 2013, 63 pages

In this thesis, *in vitro* growth parameters of shoot tips, axillary buds and node explants of GF-677 hybrid (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) rootstock were investigated in different culture media.

Firstly, no serious contamination problem occurred in any explants cultured in initial media. While no contamination was observed on shoot-tip explants, the contamination rates on node and axillary buds were determined as 2.2 %. Then the shoot tips, axillary buds and node explants were transferred to five different Murashige and Skoog (1962) (MS) media in order for them to develop and forming shoot. In regard to explant types, the lowest rate of vitrification and the highest propagation rate was obtained from the node explants. The lowest rate of vitrification was obtained in the third subculture from Medium 1 (5.2%) containing 1 mg/L of Benzyl Amino Purine (BAP) + 0.1 g/L of active carbon and from Medium 2 (7.4%) containing 1 mg/L of BAP + 0.05 g/L phloroglucinol. The best result for propagation rate (5.5) was obtained from the Medium 2 containing 1 mg/L BAP + 0.05 g/L of phloroglucinol in the third subculture.

Nine different MS media were used as rooting medium and such parameters as rate of living shoots (%), rate of rooting shoots (%), average plantlets length (cm), number of roots per plantlet (number) were examined. The best results in terms of rate of living shoots were obtained from MS media which were containing 0.5 mg/L of Indole Butyric Acid (IBA) + 0.05 g/L phloroglucinol (Medium 7) (86.6%) and 1 mg/L of IBA + 0.05 g/L of phloroglucinol (Medium 8) (84.4%). The highest values in terms of rate of rooting shoots were obtained from

the MS media which were containing 0.5 mg/L of IBA + 0.05 g/L of phloroglucinol (Medium 7) (86.6) and 1 mg/L of IBA + 0.05 g/L of phloroglucinol (Medium 8) (84.4%). The tallest plants were in the Medium 8 containing 1 mg/L of IBA + 0.05 g/L of phloroglucinol (5.8 cm). The best results in terms of number of roots per plant were obtained from the MS medium that was containing 1 mg/L of IBA + 0.05 g/L of phloroglucinol (Medium 8) (10.3 roots/plant). All cultures were kept at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with photo periods of 16 hour light and 8 hours with illumination by means of fluorescent light of 4000 luxes.

During the acclimatization period, 170 of 290 plants (58.62%) were successfully acclimated to external conditions.

Keywords: GF-677, *Prunus amygdalus* x *P. persica*, *in vitro*, clonal propagation, vitrification, shoot formation, rooting.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana her türlü desteği sağlayan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL'e, çalışmamda kullandığım GF-677 bitki materyallerini sağlayan ve uygulamanın gerçekleştirilebilmesi için laboratuvar ve malzeme desteğinde bulunan Toros Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ye teşekkürlerimi sunarım.

Denemenin kurulmasında ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Ar. Gör. Meltem BAYRAKTAR'a, Sayın Ar. Gör. Pınar NARTOP'a ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma, beni her zaman her konuda maddi ve manevi destekleyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	5
2.1 Bitkisel Özellikler	5
2.2 GF-677 Üzerine Yapılan Çalışmalar	6
2.3 GF-677'deki Doku Kültürü Çalışmaları	7
3. MATERYAL ve METOD	16
3.1 Materyal	16
3.2 Metod	17
3.2.1 Besin ortamlarının hazırlanması	17
3.2.2 Bitki eksplantlarının sterilizasyonu ve ön işlemler	19
3.2.3 Bitki eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.4 Sürgün ucu, koltuklatı tomurcuk ve nod eksplantlarının sürgün gelişimi ortamlarında sürgünlerin elde edilmesi ve çoğaltılması	20
3.2.5 Nod eksplantlarının kök gelişimi ortamlarında kültüre alınması	21
3.2.6 Kültür koşulları	22
3.2.7 Aklimatizasyon ve dış koşullara aktarma	22
3.2.8 İncelenen Özellikler	22
3.2.9 Denemenin kurulması ve verilerin değerlendirilmesi	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	24
4.1 Başlangıç Besin Ortamında Kültüre Alınan Sürgün Ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod Eksplantlarında Kontaminasyon Durumu	24
4.2 1. ve 2. Altkültüre Alınan Sürgün Ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod Eksplantlarında Görülen Gelişmeler	25
4.2.1 3., 4. ve 5. Altkültür için farklı MS besin ortamlarına alınan Sürgün ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod eksplantlarında görülen gelişmeler	33
4.3 <i>In vitro</i> kök gelişimi	48
4.4 Aklimatizasyon ve dış koşullara aktarma	56
5. SONUÇ	57
KAYNAKLAR DİZİNİ	59
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1	Çalışmada kullanılan GF-677 sürgün uçları.....16
3.2	(a) Mikroskop altında alınan koltukaltı (aksiller) tomurcuk (b) Besin ortamına aktarılan koltukaltı tomurcuk16
3.3	Çalışmada kullanılan GF-677 nod eksplantı17
4.1	Başlangıç ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen ortalama kontamine eksplant yüzdesi (%).24
4.2	(a) Nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyon durumu (b) Koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen vitrifikasyon durumu26
4.3	1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama kontamine eksplant sayısı ve ortalama canlılığını yitiren eksplant sayısı.29
4.4	1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama kontamine eksplant yüzdesi (%) ve ortalama canlılığını yitiren eksplant yüzdesi (%).29
4.5	1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama çoğalma katsayıları.30
4.6	2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant sayısı ve ortalama kallus oluşturan eksplant sayısı.32
4.7	2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve ortalama kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%).32
4.8	2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama çoğalma katsayıları.33
4.9	3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10	3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı..... 36
4.11	3. Altkültürde koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%). 38
4.12	3. Altkültürde koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı. 38
4.13	3. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%). 41
4.14	3. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı. 41
4.15	4. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%). 45
4.16	4. altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı. 45
4.17	5. Altkültürde 2 no'lu besin ortamında nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%). 47
4.18	5. Altkültürde 2 no'lu besin ortamında nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı. 47
4.19	Köklendirme ortamında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün sayısı (adet), ortalama köklenen sürgün sayısı (adet). 50
4.20	Köklendirme ortamında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün yüzdesi (%), ortalama köklenen sürgün yüzdesi (%) 50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 Köklendirme ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün sayısı (adet), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet).	54
4.22 (a) 7 no'lu ortamda gelişme gösteren bitkicikler (b) 8 no'lu ortamda gelişme gösteren bitkicikler	55
4.23 (a) 7 no'lu ortamda köklenen bitkiler (b) 8 no'lu ortamda köklenen bitkiler	55
4.24 Bitkilerin, büyüme odalarında aklimatize durumunda genel görünümü.	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Ülkeler bazında şeftali üretimi (2010)*.	1
1.2 Ülkeler bazında badem üretimi (2010)*.	1
2.1 <i>Prunus persica</i> ’nın sistematik sınıflandırması *.	5
2.2 <i>Prunus amygdalus</i> ’un sistematik sınıflandırması *.	5
3.1 MS (1962) besin ortamının içerdiği maddeler ve miktarları.	18
3.2 Bitki eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemi.	19
3.3 Eksplant girişinde kullanılan başlangıç ortamı.	20
3.4 Sürgün gelişimi ve çoğalması için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları.	21
3.5 Kök gelişimi için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları.	22
4.1 Başlangıç ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kontamine eksplant sayısı (adet) ve kontamine eksplant yüzdesi (%).	24
4.2 1. Altkültürde eksplantlarda gözlenen kontamine eksplant sayısı (adet), kontamine eksplant yüzdesi (%), canlılığını yitiren eksplant sayısı (adet), canlılığını yitiren eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.	28
4.3 2. Altkültürde eksplantlarda gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%), kallus oluşturan eksplant sayısı (adet), kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.	48
4.4 3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.	35

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.5	3. Altkültürde koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.....37
4.6	3. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.....40
4.7	3. Altkültürde vitrifikasyonlu eksplant yüzdeleri bakımından ve çoğalma katsayıları bakımından besin ortamlarının karşılaştırılması.....42
4.8	3. Altkültürde Çoğalma katsayısı bakımından eksplant tiplerinde ortalamaların karşılaştırılması.....42
4.9	4. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı(adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.44
4.10	5. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.46
4.11	Köklendirme ortamlarında kültüre alınan <i>in vitro</i> sürgünlerde gözlenen canlı sürgün sayısı (adet), canlı sürgün yüzdesi (%), köklenen sürgün sayısı (adet), köklenen sürgün yüzdesi (%).49
4.12	Köklendirme ortamlarında kültüre alınan <i>in vitro</i> sürgünlerde gözlenen canlı sürgün sayısı (adet), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet).....53

1. GİRİŞ

Dünya şeftali (*Prunus persica*) üretim miktarı 2010 yılında 20.274.287 ton olarak gerçekleşmiştir (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010a). Türkiye’de ise bu değer, 2010 yılında 534.903 ton olarak belirlenmiştir. Türkiye, Dünya’da 6. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Dünya badem (*Prunus amygdalus*) üretim miktarı ise, 2010 yılında 2.514.022 ton olarak saptanmıştır (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010b). Türkiye’de ise bu değer, 2010 yılında 55.398 tondur ve Türkiye, bu tür açısından Dünya’da 8. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1. Ülkeler bazında şeftali üretimi (2010)*.

ÜLKELER	ÜRETİM (ton)
Çin	10.718.048
İtalya	1.590.660
İspanya	1.134.750
ABD	1.044.440
Yunanistan	639.400
Türkiye	534.903
İran	500.000
Şili	357.000
Fransa	324.401
Arjantin	318.000

* <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Erişim Tarihi 21.06.2012)

Çizelge 1.2. Ülkeler bazında badem üretimi (2010)*.

ÜLKELER	ÜRETİM (ton)
ABD	1.413.800
İspanya	221.000
İran	158.050
Fas	102.170
İtalya	85.500
Suriye	73.100
Tunus	63.000
Türkiye	55.398
Cezayir	44.300
Çin	37.900

* <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Erişim Tarihi 21.06.2012)

Meyve türlerinin yetiştiriciliğinde anaç kullanımı zorunludur (Arıcı, 2008). Ülkemizde üretilen badem fidanları çöğür anaçlarına aşıllı olarak üretilmektedir. Oysa, çöğür anaçlarına göre çok üstün özelliklere sahip klon anaçlar birçok ülkede kullanılmaktadır. Ülkemizde kullanımı henüz yaygınlaşmamış olan bu anaçların kolay köklenme, kuvvetli gelişme, hastalıklara dayanıklılık gibi bazı üstün özellikleri vardır. Bu bakımdan klonal anaçlar, çöğür anaçlara göre daha büyük avantajlara sahiptirler (Demirkök, 2006).

Meyveciliğin temel unsurlarından olan anaç seçimi, tüm dünyada gelişmeleri dikkatle takip edilen önemli konulardan birini teşkil etmektedir. Özellikle sık dikime yönelik toprak ve iklim koşullarına uygun anaç geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Ekonomik açıdan ürünü erken almak ve birim alandan maksimum ürün elde etmek için klonal anaçlar kullanılmalıdır. Melezler çok kuvvetli olup kök sistemleri toprağa iyi tutunmaktadır ve yoğun yetiştiricilik yapılan ülkelerde bu klon anaçları gittikçe yaygınlaşmaktadır. Klonal anaç kullanımı ile, genotipin devamlılığı sağlanmakta ve uniform populasyon oluşturulmaktadır (Arıcı, 2008; Özsu, 2003).

GF-677, *Prunus persica* (şeftali) × *Prunus amygdalus* (badem) bir hibrit anacıdır. 677 ((*Prunus persica*) × (*Prunus amygdalus*)), diğer adıyla (Peach Amnedier), 1965 yılında Fransa’da INRA-Grand Farad Araştırma Merkezi’nde Bernhard tarafından üretilmiştir (Tsipouridis and Thomidis, 2003; Garoosi et al., 2010). Kalkerli topraklara karşı toleranslı bir hibrittir. Doku kültürü tekniklerinin gelişmesi ile Fransa’ da şeftali için baskın ve önemli bir meyve anacı haline gelmiştir (Sepahvand et al., 2012). GF-677’nin toprakta gelişimi iyidir, ağır, orta ve hafif topraklar için uygundur. Kireçli toprakların yanı sıra kuraklığa toleranslı, demir klorozuna ve *Phytophthora*, kök kanseri hastalıklarına da dayanıklıdır. Yüksek kalitede meyve oluşumu sağlayan kuvvetli bir anaçtır. Doku kültürü ve aşı ile vegetatif olarak çoğaltılır. Diğer meyve türleri gibi meyveye yatma sorunu olmayıp, ağaçları hemen ikinci yılda meyve vermeye başlayan şeftaliler için kısa sürede büyük taçlı ağaçlar oluşturması bakımından GF-677, bugün dünyanın birçok yerinde olduğu gibi Ege, Akdeniz, Marmara ve GAP bölgesi için de uygun bir anaçtır. Yeniden dikim için önerilebilir ve kuvvetli gelişim gösteren güçlü bir hibrittir. Bu hibrit anacı, aynı zamanda, erik, badem ve nektarin için de aşılamaya uygunluk göstermektedir (Demirkök, 2006; Marino ve Ventura, 1997; Antonopoulou, 2005; Gür, 2011; Fitotechniki, 2012).

Sert kabuklu meyve türlerinin yetiştiriciliğinde, aşılama, çeliklerin köklendirilmesi, kök sürgünleri ve daldırma gibi çeşitli vegetatif çoğaltım yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler, her zaman seri ve ekonomik bir çoğaltım için yeterli olmamaktadır. Artık günümüzde yapılan çalışmalar meyve türlerinin üretiminde alternatif bir yöntem olarak doku kültürü üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu amaçla değişik türler için, farklı doku kültürü yöntemleri denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Kestane Araştırma Grubu, 2010).

Oldukça kuvvetli olan GF-677, kök sürgünleri üretmemekte ve şeftali pasına, taç tümörüne, kök-urllarına karşı da direnç göstermektedir. Fe eksikliğine karşı da toleranslı bir anaç olmasına rağmen, düşük köklenme yüzdesi nedeni ile çelikle büyük ölçekte çoğaltımlarında sıkıntı yaşanmaktadır. Klasik çoğaltmayla kıyaslandığında, mikroçoğaltım yolu ile daha hızlı ve daha yüksek oranda çoğaltılabildiklerinden dolayı, bu anacın *in vitro* mikroçoğaltımı, ticari üretimi hedefleyen amaçların gerçekleştirilmesinde çok önem taşımaktadır (Marino ve Ventura, 1997; Molassiotis et al., 2003; Younas et al., 2008).

Bu anacın eşeyli çoğaltımı, uniform olmayan fidelerin üretimini ve genetik açılmaları sonuçlamaktadır. Bu problemi önlemek üzere, eşeysiz yöntemler tercih edilmektedir. Ancak, GF-677'nin eşeysiz çoğaltımı zordur ve mikroçoğaltımı sırasında vitrifikasyon, rozetsi sürgün oluşumu, aklimatizasyondan sonra büyümeyen ve dormant halde kalan köklü bitkicikler ve zayıf köklenme gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca zayıf köklenmenin yanında, yaprakların genişleyen ve istenmeyen büyümesi de *in vitro* kültür süresi boyunca karşılaşılan başlıca ana problemlerdir (Sepahvand et al., 2012).

Doku kültüründe görülen vitrifikasyon (camsılaşma) nedenleri; osmozun bozulması, besin ortamında çok fazla sitokininin olması, hücre duvarında lignin eksikliği, yanlış agar kullanımı ve kültürün yaşlanmasıdır. Çözüm önerileri ise; sıcaklığı düşürme, havalandırmayı ve agar miktarını arttırma, sitokinin azaltılması, phloroglucinol ilavesi, agar tipini değiştirme ve daha sık transfer yapılmasıdır (Şenyay, 2008).

Ülkemizde GF-677 hibrit anacının, üretiminin arttırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle mikroçoğaltım tekniklerinin klonal anaç üretimi açısından önemi son derece büyüktür. Gerek mikroçoğaltım teknikleriyle üretimin arttırılması ve gerekse de yukarıda sayılan çeşitli olumsuzlukların çözülmesi

amacıyla, çalışmamızda GF-677 hibrit meyve anacının klonal çoğaltımı açısından uygun besin ortamlarının ve kültür koşullarının saptanmasına çalışılmıştır. Bu çalışmadan olumlu sonuçlar alınması durumunda, bu araştırmada kullanılan yöntemlerin ülkemizde bu materyalle yapılacak üretilere ışık tutması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Bitkisel Özellikler

GF-677 hibrit anacını oluşturan, Rosaceae familyasının *Prunus* cinsinde yerini alan *Prunus persica* (şeftali) ve *Prunus amygdalus* (badem) türlerinin sistematik sınıflandırmaları Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *Prunus persica*’nın sistematik sınıflandırması *.

Sistematikteki Yeri	
Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki Çenekliler)
Takım	Rosales
Familya	Rosaceae (Gülgiller)
Cins	<i>Prunus</i>
Alt cins	<i>Amygdalus</i>
Tür	<i>Prunus persica</i>

* <http://tr.wikipedia.org/wiki/%C5%9Eeftali> (Erişim Tarihi: 13.06.2012)

Çizelge 2.2 *Prunus amygdalus*’un sistematik sınıflandırması *.

Sistematikteki Yeri	
Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki Çenekliler)
Takım	Rosales
Familya	Rosaceae (Gülgiller)
Alt Familya	Prunoideae
Cins	<i>Prunus</i>
Alt Cins	<i>Amygdalus</i>
Tür	<i>Prunus amygdalus</i>

* <http://tr.wikipedia.org/wiki/Badem> (Erişim Tarihi: 13.06.2012)

GF-677'nin genel özellikleri (Demirkök, 2006):

Badem x şeftali melez anacıdır.

Fransa orijinlidir.

Vejetatif yolla çoğaltılır (Doku kültürü ve aşı ile).

Erik, badem, nektarin ve şeftaliler için aşılama uygundur.

Patojensiz bitkilerdir.

Arazi koşullarında bir örnek büyüme sağlar.

Yeniden dikim için önerilir.

Kuvvetli gelişim gösteren güçlü ağaçlardır.

Toprakta gelişimi iyidir.

Kuraklığa toleransı yüksektir.

Yüksek verim sağlar.

Ağır, orta ve hafif topraklar için uygundur.

2.2 GF-677 Üzerine Yapılan Çalışmalar

Emeraude (erkenci) ve Zephyr (geçci), GF 305 (şeftali meyve anacı), GF-677 ve Cadaman® Avimag (hibrit meyve anaçları) üzerine aşılanmışlardır ve bölünmüş parseller deneme desenine göre dikilmişlerdir. Meyve verimi ve vejetatif büyüme yıllık olarak incelenmiştir. Vejetatif büyüme hibrit anaçlarda şeftali anaçlarından daha iyi bulunmuştur. En yüksek meyve üretimi Cadaman'da saptanmıştır. Meyve anaçları ile ilgili verim farklılığında, meyve anacı x çeşit etkisi, Emeraude'de daha iyidir (Bussi et al., 2002).

Yapılan bir başka çalışmada GF-677 hibritinin tuzluluk stresine karşı verdiği yanıt değerlendirilmiştir. Bu deneme 3 tekerrürlü olarak, tamamen rastgele kurulmuş deneme çerçevesinde ve 0, 15, 30, 45, 60 ve 75 mmol/L içeren NaCl'nin 6 konsantrasyonu ele alınmıştır. Bu çalışmada, köklerde ve sürgünlerde Cl^- , Na^+ , K^+ birikiminde tuzluluğun etkisi ve ayrıca bitki boyu, yaprak alanı, üst ve alt gövde çapı, internod sayısı, klorofil içeriği, kök yaş ve kuru ağırlıkları, köklerin ve sürgünlerin K^+/Na^+ oranı gibi bitki büyümesine ait özellikler değerlendirilmiştir. GF-677 meyve anacında, tuzluluk sürgünlerde Na^+ ve Cl^- birikimine neden olmuştur. Tüm bitkinin K^+/Na^+ oranı sadece 75 mmol/L NaCl

konsantrasyonunda önemli ölçüde azalmıştır. GF-677 meyve anacı, 60 mmol/L NaCl konsantrasyonuna kadar tuzluluğa tolerans göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda, GF-677'nin yüksek tuzluluk konsantrasyonlarına karşı daha az duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Klorofil içeriği ile kök yaş ve kuru ağırlıkları sadece 75 mmol/L NaCl'nin altındaki uygulamalarda azalmıştır ve internod sayıları, gövde uzunluğu ve sürgünlerin yaş ve kuru ağırlıkları önemli ölçüde olmamakla beraber %5 ihtimalde azalmıştır (Najafian et al., 2008).

2.3 GF-677'deki Doku Kültürü Çalışmaları

Bilimsel yayınlarda GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) ile ilgili doku kültürü ve mikroçoğaltım konularında yeterli sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmalar çoğunlukla köklenme ve mikroçoğaltım üzerine gerçekleştirilmiştir.

GF-677 şeftali meyve anacının *in vitro* sürgün çoğaltımında farklı BA konsantrasyonlu (0.3, 0.6, 0.9 mg/l) Murashige & Skoog (1962) ve Anderson (1984) ortamlarının etkileri incelenmiştir. MS ortamında sürgün çoğaltması, uzaması ve büyümesi en iyi iken, AND ortamındaki sürgünler, klorotik, küçük ve camsı bulunmuşlardır. 0.6 mg/l konsantrasyonu, 2 cm uzunluğundan daha boylu sürgünler üretmiştir. BAP'ın daha yüksek seviyesi (0.9 mg/l) ise kallus oluşumunu ve sürgün apikal nekrozunu teşvik etmiştir. En iyi kök sistemi, 3 mg/l IBA (indolbutirik asid) ekli ½ MS ortamında gelişmiştir. IBA'nın daha yüksek seviyesi (4.0 mg/l) kallus oluşumunu teşvik etmiştir ve normal kök gelişimini inhibe etmiştir (Ahmad et al., 2003).

GF-677 şeftali meyve anacının *in vitro* köklenmesi için, 3 oksin tipi (IAA, IBA, NAA) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/l konsantrasyonlarında denenmiştir. Kök sayıları ve uzunlukları, oksin tipleri ve konsantrasyonları tarafından önemli derecede ($p < 0.05$) etkilenmiştir. En uygun konsantrasyon, her bir oksin için farklı bulunmuştur. En yüksek kök sayısı (5 adet) ve 1.5 cm uzunluğundan büyük kökler (4 cm) kallus arafazı olmadan 0.4 mg/l IBA içeren ortamda elde edilmiştir. Bununla birlikte, NAA ve IAA kök büyümesini olumsuz etkilemiştir. Kallus oluşumu NAA tarafından güçlü bir şekilde uyarılmıştır. Bu nedenlerden dolayı, GF-677 şeftali meyve anacının *in vitro* köklenmesi için IBA tercih edilebilir bir oksin olarak belirlenmiştir. İyi köklenmiş bitkicikler seraya başarılı bir şekilde aktarılmıştır ve %80 hayatta kalabilme oranı ile büyümüşlerdir (Ahmad et al., 2004).

İki karbon kaynağı olan sorbitol ve sükrozun, GF-677 şeftali meyve anacının *in vitro* sürgün çoğaltılmasında ve köklenmedeki etkileri 15, 30, 45 ve 60 g/l konsantrasyonları ele alınarak karşılaştırılmıştır. Eksplant başına düşen sürgünlerin en yüksek sayısı, kullanılabilir sürgünler ve en yüksek canlı ağırlığa sahip olan sürgünler 30 g/l sorbitolde elde edilmiştir. GF-677, *in vitro* sürgün çoğaltımı için sükrozun etkili belirgin katkısı görülmemiştir. Benzer şekilde, en iyi kök gelişimi köklenme yüzdesi, köklenmiş eksplant başına düşen kök sayısı ve 1.5 cm uzunluğundan büyük kökler 30 g/l sorbitol kullanımında elde edilmiştir. Sorbitol bundan dolayı, GF-677 şeftali meyve anacının *in vitro* sürgün çoğaltımının ve köklenmesinin gelişimi için, sükrozdan daha iyi bir karbon kaynağı olarak belirlenmiştir (Ahmad et al., 2007).

GF-677 şeftali meyve anacının kimyasal bileşiminde ve *in vitro* köklenmesinde, karanlığın (D) ve radyasyon özelliğinin (350 – 740 nm) etkisi çalışılmıştır. Sürgün eksplantları, 4 hafta için floresan lambalar kullanılarak serin beyaz (kontrol) (W), kırmızı (R), mavi (B), yeşil (G) ya da sarı (Y) radyasyona maruz bırakılmışlardır. Eksplantların bazıları, köklenme dönemi süresince karanlıkta tutulmuştur ve diğerleri sadece ilk 2 veya 4 gün için R, B, G, Y veya D altında muhafaza edilmiştir ve daha sonra W altına transfer edilmişlerdir. W, GF-677 eksplantlarının ek kök oluşumları için en etkili radyasyon kaynağı olarak belirlenmiştir. Sürekli D altında kalan bitkilerde, kökler inhibe edilmiştir ve tüm uygulamalarda R, kök büyümesini azaltmıştır. 2 veya 4 gün D' ye, Y veya B' ye maruz kalıp W altına alınanlar benzer şekilde W' nin yaptığı gibi, ek kök gelişimine yardım etmişlerdir. G, önemli ölçüde köklerdeki Fe konsantrasyonunu arttırmıştır (Antonopoulou et al., 2004).

Antonopoulou ve ark. (2007) araştırmalarında, GF-677 meyve anacının *in vitro* köklenmesinde Fe-EDDHA'nın (%6 Fe) demir tuzlarının şelat formunun etkisini çalışmayı amaçlamışlardır. MS temel ortamının Fe-EDTA (%12 Fe) demir tuzu, 3 konsantrasyonda: 93.5, 187.0 ve 280 mg/l (sırasıyla 5.6, 11.2 ve 16.8 mg/l Fe) uygulanan Fe-EDDHA ile değiştirilmiştir. Fe-EDDHA'nın her uygulaması için, 4 konsantrasyonda eklenen (0, 0.1, 1.0 ve 10 mg/l) askorbik asidin etkisi araştırılmıştır. Kültürün 4 hafta sonrasında, 280 mg/l Fe-EDDHA içeren ortamda büyüyen eksplantlar en iyi köklenme sonucunu vermiştir. Askorbik asit konusunda, köklenmede net bir teşvik edici etki bulunamamıştır (Antonopoulou et al., 2007).

Myrobolan 29-C, MaxMa 14, MaxMa 60, GF-677 ve GN anaçlarının sürgün uçları ve yan sürgünleri kullanılarak doku kültürü çoğaltma olanakları araştırılmıştır. Eksplantlar 1 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA, 1 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA, 2 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA+0.5 mg/l GA₃, 1 mg /l BAP+0.2 NAA+0.5 mg/l GA₃, 2 mg/l BAP+0.02 NAA+0.5 mg/l GA₃, 2 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA+0.5 mg/l GA₃ hormonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Ortamlar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmesi de en fazla sürgün oluşumu Myrobolan için MS+1 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA, MaxMa 60 için MS+2 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA, MaxMa 14 için MS+2 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA+0.5 mg/l GA₃, GF-677 için MS+1 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA, GN için MS+1 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA+ 0.5 mg/l GA₃ içeren ortamlarda elde edilmiştir (Arıcı, 2008).

AK-1, AK-2 ve GF-677 badem x şeftali melez genotipleri ile Ferragnes badem, Francoise şeftali ve Ninfa kayısı çeşitlerine ait sürgün uçları kullanılmıştır. Alınan sürgün uçlarının canlılık, sürgün oluşturma ve aşı tutma oranları incelenmiştir. Araştırmada MS makro ve mikro besin elementleri, vitaminleri ve Fe-NaEDTA kompozisyonu kullanılmıştır. Sürgün geliştirme ve çoğaltma aşamasında 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l GA₃ konsantrasyonları kullanılmıştır. Çalışmada, canlılık oranı AK-1 genotipinde %50, AK-2 genotipinde %25, GF-677 genotipinde %37.5, Ferragnes %85, Francoise %1, Ninfa %1; kardeşlenme sayısı AK-1 genotipinde 3 sürgün/eksplant, GF-677 genotipinde 2 sürgün/eksplant, AK-2 genotipinde 8 sürgün/eksplant, Ferragnes de 3 sürgün/eksplant; aşı tutma oranları AK-1 genotipinde %25.1, AK-2 genotipinde %34.4 ve GF-677 genotipinde %25.0 olarak bulunmuştur (Çelik, 2008).

In vitro mikro çeliklerde *Agrobacterium rhizogenes* enfeksiyonu, bazı meyve çeşitlerinin köklenmesini geliştirmektedir. *A. rhizogenes* suşu ile enfekte edilen hormon ilaveli ve hormonsuz; 2 hibrit (Citation (erik x şeftali), GF-677 (şeftali x badem)) meyve anacının, *Pyrus pyraeste*, erik, elma ve badem köklenmesi ile ilgili karşılaştırılmalı bir çalışma yapılmıştır. 3 yanıt alınmıştır: oksinsiz köklenen genotipler; sadece oksinle köklenen genotipler; sadece enfeksiyondan sonra köklenen genotipler. Bütün genotipler bakteriyel enfeksiyondan sonra köklenme göstermişlerdir. İlk grupta oksinler köklenme yüzdesini arttırmıştır. Köklenme yüzdeleri oksin kombinasyonları enfeksiyon ile azalmaya eğilimli iken, enfeksiyonlu ve enfeksiyonsuz hormonsuz ortamda çok önemli farklar bulunmamıştır. İkinci grupta, hormonsuz ortamda enfeksiyon

köklenmeyi arttırmıştır; ek olarak armutlarda oksinler ve enfeksiyon arasında sinerjik bir etki oluşmuştur. 3. Grupta, sadece enfeksiyon köklenmeyi teşvik etmiştir. Enfeksiyondan elde edilen köklerden tesadüfi örneklerin moleküler analizleri yapılmıştır. *RoIB* ve *vir* genlerinin dizi amplifikasyonu PCR kullanılarak yapılmıştır. Transgenik olmayan kökler ve transgenik olarak doğrulanan kökler sırasıyla %67 ve %6.8'dir. Geri kalan %26.2' sinde ise transgenik yapı doğrulanamamıştır. Bazı mikro çelikler, hem transforme hem de transforme olmamış kökler geliştirmişlerdir (Damiano and Monticelli, 1998).

Sürgün ucu yöntemiyle *in vitro* klonal mikroçoğaltım yapılan bir çalışmada AK-1, AK-2 ve GF-677 badem x şeftali melez genotiplerine ait sürgün uçları kullanılmıştır. Alınan sürgün uçlarının canlılık, sürgün oluşturma ve köklenme oranları incelenmiştir. Araştırmada MS makro ve mikro besin elementleri, vitaminleri ve Fe-NaEDTA kompozisyonu kullanılmıştır. Sürgün geliştirme ve çoğaltma aşamasında 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l GA₃ konsantrasyonları, köklendirme aşamasında ise 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l IBA ve 0.1 mg/l GA₃ konsantrasyonları ile büyüme düzenleyici içermeyen kontrol MS ortamları kullanılmıştır. Çalışmada, canlılık oranı AK-2 genotipinde %91.25, AK-1 genotipinde %88.75 ve GF-677 genotipinde %85; kardeşlenme sayısı ise AK-1 genotipinde 2.43 sürgün/eksplant, GF-677 genotipinde 0.88 sürgün/eksplant ve AK-2 genotipinde 0.5 sürgün/eksplant; köklenme oranı AK-1 genotipinde %24.06, GF-677 genotipinde %22.25, AK-2 genotipinde %6.19; mikrosürgün başına düşen kök sayısı AK-1 genotipinde 2.78 kök/mikrosürgün, GF-677 genotipinde 1.95 kök/mikrosürgün ve AK-2 genotipinde 0.94 kök/mikrosürgün olarak bulunmuştur (Demirkök, 2006).

Antonopoulou ve ark. (2005) tarafından GF-677 şeftali x badem hibrit klonun *in vitro* köklenmesinde, riboflavin (B2) vitaminin etkisi çalışılmıştır. Riboflavin 5 konsantrasyonda eklenmiştir: 0 (kontrol), 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/l. Kültürde 4 hafta sonra, riboflavin, eksplantların köklenmesini teşvik etmemiştir ve köklenme, kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında çok düşük bulunmuştur. Vitamin B2'nin en yüksek 2 mg/l konsantrasyonunu içeren köklenme ortamındaki sürgünlerin yüksek bir yüzdesi, kloroz ve uç nekroz septomları göstermiştir (Antonopoulou et al., 2005).

GF-677 hibrit meyve anacının, GNH (Garroosi, Nezami ve Haddad) ortamında *in vitro* sürgün çoğaltımında bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, GF-677 meyve anacının mikroçoğaltımı için

uygulanabilir bir protokol sağlama kapsamında, GNH ortamında bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin çoğaltımda ve kök indüklenmesinde etkilerine yoğunlaşmıştır. Sonuçlar, 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA konsantrasyonlarının en yüksek normal koltukaltı sürgünleri ürettiğini göstermiştir. ZR (Zeatin ribozide) ekli ortam sadece tek sürgünler üretmiştir. En yüksek köklenme oranı (%40'a kadar), 2 mg/l IBA içeren besin ortamından elde edilmiştir (Garoosi et al., 2010).

Yapılan bir çalışmada GF-677 hibrit anacının doku kültürü teknikleri ile çoğaltımının kolaylaştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada kullanılan eksplantlar Nisan ayında sürgün uçlarından alınmıştır ve civa klorür ile sterilize edilmiştir. Kültür için en uygun ortam modifiye edilen Knop makroelementleridir. Bu ortamda, çoğaltım için en iyi sonucu 1 mg/l BA kullanımı göstermiştir; en yüksek köklenme oranı, 7 gün karanlık periyot altında 1.6 mg/l thiamine ve 0.3 mg/l NAA içeren LS ortamına maruz bırakılan eksplantlardan elde edilmiştir. Çoğaltılmış bitkiler birikim için Jiffy-7'ye transfer edilmiştir ve sonra saksılara aktarılmıştır (Kamali et al., 2001).

GF-677 hibrit şeftali anacının büyümesinde ve köklenmesinde paclobutrazol (N-dimetilaminosuksinamik asit) ve 2-naphtoxyacetic asidin (NAO) etkisi incelenmiştir. Paclobutrazolun ortam sterilizasyonundan önce ve sonra ilave edilmesiyle ortaya çıkan etkisinin yanı sıra, bu maddelerin bitki başına düşen ortalama kök sayısına, bitki başına düşen köklerin ortalama uzunluğuna ve bitki boyuna etkisi de değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, paclobutrazol ilaveli, oksinsiz ortamlarda köklenen bitkilerin, bitki başına düşen en düşük kök sayısına sahip olduklarını göstermiştir. Paclobutrazol, hem bitki boyunda, hem de köklerin uzunluğunda önemli bir istatistiksel negatif etki göstermiştir. Sonuç olarak GF-677 meyve anacının köklenmesi için 0.43 µM paclobutrazol + oksin kullanmak yararlı olabileceği ileri sürülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlar, özellikle bitki boyunda toprağa nakledildikten 14 gün sonra baskılamayı etkilemiştir (Křižan et al., 2006).

GF-677 hibrit meyve anacının *in vitro* köklenmesinde etilenin etkisi incelenmiştir. Tüp kapak tipleri (örneğin; gaz değişimi için pamuk tıkaç, hava geçirmez kauçuk başlık ve ethysorb bantlı kauçuk başlık) ve köklenme kültür ortamları, GF-677 meyve anacının köklenmesinde ve kültür atmosferinin gaz bileşiminde etkileri açısından karşılaştırılmışlardır. Tüpün içindeki etilen birikimini hızlandıran kauçuk kapak, güçlü şekilde köklenme süresini azaltmıştır ve bazı durumlarda son köklenme yüzdesini pamuk tıkaçta göre yükseltmiştir.

Ethysorb kültüre alınan mikro çeliklerdeki, 9 gün içinde daha az köklenme yüzdesi gösteren sürgünler tarafından üretilen etileni emmektedir. Aksine 14 gün sonra iki uygulama arasında, köklenmede önemli ölçüde fark bulunmamıştır. Karbondioksit konsantrasyonu bütün uygulamalarda 5 günden 9 güne kadar benzer bulunmuştur ve köklenme için etkisiz görünmüştür. Asetilsalisilik asidin köklenmedeki etkisi belirsizdir. Kök sayısı ve uzunluğu çeşitli uygulamalarla önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bu sonuçlar, hava geçirmez kapak kullanımının etilen birikimini hızlandırdığını ve GF-677 mikro çeliklerin köklenme süresini azaltabildiğini ispatlamaktadır. Bununla birlikte, köklenme periyodunun sonuna doğru serbest gaz değişimi (9-14 gün arası) yaprak sararmasını önlemek için tavsiye edilebileceği ifade edilmiştir. Bitkiciklerde, *ex vitro*'ya transfer edildikten sonra büyüme ve hayatta kalabilme bakımından, uygulamalar ile arasında önemli ölçüde bir fark bulunmamıştır (Marino and Ventura, 1997).

GF-677 meyve anacının *in vitro* köklenmesinde organik (Fe-EDTA ve Fe-EDDHA) ve inorganik (FeCl₃) demir maddelerinin etkisi çalışılmıştır. Demir yokluğunda veya FeCl₃ varlığında daha az köklenme görülmüşken, tamamen köklenme (%100) Fe-EDDHA ile beslenen eksplantlarda gözlenmiştir. Buna karşılık, deney sonunda yüksek demir içeriği ve son derece düşük klorofil içeriği gösteren, Fe-EDTA ile beslenen eksplantlarda kök oluşumu gözlenmemiştir (Molassiotis et al., 2003).

Çalışmada, Garnem, GF-677, Cadaman ve Myrobalan 29 klonunun sürgün ucu ile *in vitro* klonal çoğaltılması ve bu bitkilerin kök-ur nematodlarına (*M. incognita* ve *M. javanica*) dayanıklılığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, GA₃'ün sabit 0.05 mg/l ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarını (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) içeren MS ve modifiye MS (MST) ortamları mikroçoğaltımda kullanılmıştır. IBA ve Fe-EDDHA kombinasyonlarını içeren MS ve MST ortamları sürgünlerin köklendirmesi amacıyla kullanılmıştır. En yüksek yan sürgün sayısı Garnem, GF-677 ve Cadaman anacı için 2.0 mg/l BAP içeren MST ortamından, Myrobalan 29 klonu için 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. En iyi köklenme yüzdesi, 1.5 mg/l IBA içeren ortamda GF-677 için 100 mg/l, Garnem için 500 mg/l ve Cadaman anacı için 500 mg/l Fe-EDDHA ilavesiyle elde edilmiştir (Özbek, 2011).

Özden'in (2007) yaptığı çalışmada, bademe anaç olarak kullanılan GF-677 hibrit (*P. amygdalus* x *P. persica*) anacının *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturulmuştur. Boğum eksplantları farklı konsantrasyonlarda (0.5-2.0 mg/l) BA

(benziladenin) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. 1 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınan boğum eksplantlarında yüksek oranda sürgün oluşumu ve kardeşlenme sağlanmıştır. *In vitro* sürgünlerin genç eksplantları, farklı konsantrasyonlarda TDZ (thidiazuron) veya BA içeren MS ya da TDZ ve BA'nın NAA (naftalen asetik asid) ile farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Yaprak eksplantları üç hafta karanlık periyottan sonra 16 saat fotoperiyoda tabii tutulmuşlardır. Üç haftalık karanlık uygulaması süresince yaprak eksplantlarının kesik yüzeylerinde kallus oluşumları başlamıştır. Yaprak eksplantları üç hafta aralıklarla taze besin ortamında altkültüre alınmışlardır. 1 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınan *in vitro* sürgünlerin dip kısımlarında beyaz renkli yoğun bir kallus oluşumu başlamıştır. Sürgün diplerindeki kallus dokularından rejenere olan adventif sürgünler boylarının uzatılması amacıyla 0.0, 0.1 veya 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Sürgün boyunun uzaması için en etkili kültür ortamının 0.5 mg/l BA, 30 g/l sukroz ve 5.5 g/l agar içeren MS besin ortamı olduğu belirlenmiştir. Boyları uzayan sürgünler köklendirilmek amacıyla 0.05-2.0 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. 1 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında %84.2 oranında köklenme elde edilirken, köklü bitkiciklerin %66.4'ü dış koşullara alıştırılabilmektedir (Özden, 2007).

Yapılan çalışmada, myo-inositol ve thiamine vitaminlerinin GF-677 mikro çoğaltımında etkisi incelenmiştir. GF-677' nin genişleyen ve istenilmeyen yaprak büyümesi, zayıf köklenme ile birlikte *in vitro* kültür boyunca karşılaşılan ana problemlerdir. Eksplantlarda ve sürgün büyümesi dönemlerinde MS ortamında 10 mg/l ve 100 mg/l myo-inositolun etkileri çalışılmıştır. Thiamine ise LS ortamında 0, 1.6, 2.8 ve 4 mg/l konsantrasyonlarında köklenme döneminde kullanılmıştır. Bu deneme, tamamıyla tesadüfi 10 tekerrürlü kurulmuştur. 10 mg/l konsantrasyonundaki myo-inositol, sürgünlerin rozetlenmesinin yanında istenmeyen yaprak genişliğini de önleyebilmiştir. 1.6 mg/l thiamine konsantrasyonu da sürgünlerin köklenmesinde oldukça etkili olmuştur (Sepahvand et al., 2012).

İki *Prunus* meyve anacının (GF-677 ve Nemared) *in vitro*' da kültür ortamının artan KCl konsantrasyonlarına karşı tepkisi incelenmiştir. Sürgünler 8 hafta boyunca *in vitro*' da 0, 5, 10, 15, 20, 40 ve 80 mM KCl ilaveli MS ortamında büyütülmüştür. KCl konsantrasyonu 0'dan 40 mM arttırıldığında, eksplant başına düşen sürgün sayısı, her iki meyve anacında da önemli ölçüde

etkilenmemiştir. Bununla birlikte, Nemared meyve anacı, ortamın ayrı KCl konsantrasyonlarında GF-677'den daha fazla eksplant başına düşen sürgün sayısı oluşturmuştur. 80 mM KCl'nin ortama dahil edilmesi, her iki meyve anacında büyümede azalmaya yol açmıştır. Nemared meyve anacının dokularındaki sodyum, Fe, Mn ve Zn konsantrasyonu önemli ölçüde GF-677'nin değerlerinden daha yüksek çıkmıştır (Sotiropoulos et al., 2006).

Murashige & Skoog (MS) ve Lepoivre (LP) iki kültür ortamının, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l BAP ve 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l NAA ilaveli konsantrasyonlarının, GF-677 meyve anacında yapraklardan sürgün rejenerasyonuna etkisi incelenmiştir. %20.88 rejenere olmuş sürgün, 1.90 adet sürgün sayısı, 2.28 cm sürgün uzunluğu üreten MS ortamının yanısıra LP ortamı, %29.85 rejenere olmuş sürgün, 3.39 adet sürgün sayısı ve 3.43 cm sürgün uzunluğu üreten en iyi ortam olarak belirlenmiştir. Bundan başka, LP ortamı daha uzun ve sağlıklı sürgünler üretmiştir, oysa MS ortamında büyüme engellenmiş ve sarı sürgünler gözlenmiştir. Ortam ve bitki büyüme düzenleyicileri arasındaki interaksiyon konusunda, en iyi etkileşim 2.0 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren LP ortamında %55 rejenere sürgün, 4.28 adet sürgün sayısı ve 4.25 cm sürgün uzunluğu ile bulunmuştur. MS ortamında ise sitokininlerin ve oksinlerin aynı kombinasyonlarında % 40 rejenere sürgünler, 3.20 adet sürgün sayısı ve 3.80 cm sürgün uzunluğu gözlenmiştir. Köklenmede ise Fe-EDDHA ve Fe-EDTA'nın 100, 200 ve 300 mg/l konsantrasyonlarının etkisi değerlendirilmiştir. 200 mg/l Fe-EDDHA, %95 köklenme yüzdesi, 3.40 adet kök sayısı ve 6.88 cm kök uzunluğu üreterek üstün şelatlama ajanı olduğunu ispat etmiştir. Diğer taraftan, 100 mg/l Fe-EDTA yaklaşık %40 köklenme yüzdesi, 1.83 adet kök sayısı ve 2.57 cm kök uzunluğuna yol açmıştır. Güçlü ve daha küçük kökler Fe-EDDHA ortamında görülürken, klorotik ve küçük kökler ise Fe-EDTA bulunan ortamda gözlenmişlerdir (Ul Hasan et al., 2010).

Çalışmada GA₃'ün ekzojen uygulamasının etkisi ve GF-677 rozetsi bitkiciklerin sürgün vermesinde hem yaprakların, hem de petiollerin varlığı incelenmiştir. GA₃ 12.5 ve 50 mg/l uygulama miktarlarında rozetsi bitkiciklerin sürgün vermesinde önemli ölçüde artışlara neden olmuşlardır. Yapraksız ve petiolsuz rozetsi bitkicikler veya sadece 1 petiyollu olanlar; ¼ yaprak, tüm petiyol veya tüm petiyol ve yapraklı olanlarla kıyaslandığında önemli ölçüde daha iyi sürgün vermişlerdir. Ek olarak, Mg + Zn + B (iz) ilaveli Murashige & Skoog ortamı bitkiciklerin canlı ağırlığını ve su içeriğini önemli ölçüde arttırmıştır (Tsipouridis and Thomidis, 2003).

Farklı karbon kaynaklarının, GF-677 meyve anacının *in vitro* sürgün çoğaltımı ve köklenme üzerine olan etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, GF-677 meyve anacının köklenme durumunda 20 g/l glukozun, 20 g/l sukroza göre daha uygun bulunduğunu, sürgün çoğaltımı ve büyümesi ile ilgili olarak, sukroz + glukozun (her biri 15 g/l) en uygun karbon kaynağı kombinasyonu olduğunu göstermiştir (Younas et al., 2008).

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

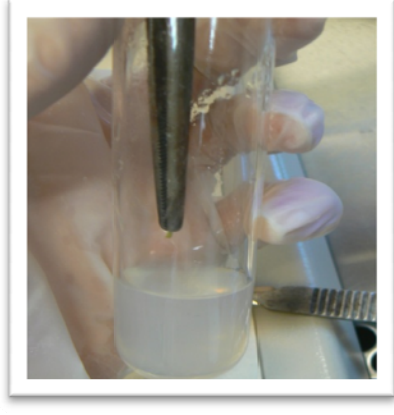
Toros Tarım A.Ş.'ye ait anaç materyal serasında (Adana koşullarında) yetiştirilen GF-677 şeftali-badem hibrit anacı materyal olarak kullanılmıştır. Eksplant olarak taze sürgünlere ait 1 cm uzunluğunda sürgün uçları (Şekil 3.1), mikroskop altında alınan koltukaltı (aksiller) tomurcuklar (Şekil 3.2 (a),(b)) ve nodlar (Şekil 3.3) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan GF-677 sürgün uçları



(a)



(b)

Şekil 3.2. (a) Mikroskop altında alınan koltukaltı (aksiller) tomurcuk **(b)** Besin ortamına aktarılan koltukaltı tomurcuk



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan GF-677 nod eksplantı

3.2 Metod

Araştırmada, mikroçoğaltım için kullanılmak üzere GF-677 bitkilerine ait sürgün uçları, mikroskop altında alınan koltukaltı (aksiller) tomurcuklar ve nodlar *in vitro* koşullarda çoğaltılmaya çalışılmıştır. Tüm eksplantlar, değişik ortam içeriğine sahip MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Besin ortamlarının hazırlanması, bitki eksplantlarının sterilizasyonu ve eksplantların kültüre alınması, çoğaltılması, köklendirilmesi ve aklimatizasyondan sonra dış koşullara aktarılması ile ilgili yöntemler aşağıda ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

3.2.1 Besin ortamlarının hazırlanması

Araştırmada Duchefa firmasının hazır MS besin ortamı kullanılmıştır. Vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri stok halinde hazırlanmış ve besin ortamına ilave edilmiştir. Mineral maddeler, vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve agar/gelrite içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. MS (1962) besin ortamının içerdiği maddeler ve miktarları.

Mikro Elementler	MS Besin Ortamındaki Miktarlar (mg/L)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Makro Elementler	
CaCl ₂	332.02
KH ₂ PO ₄	170.00
KNO ₃	1900.00
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650.00
Vitaminler	
Glycine	2.00
Myo-Inositol	100.00
Nicotinic Acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10

Sürgün oluşumu, sürgün gelişimi ve köklendirme çalışmaları için bitki büyüme düzenleyicilerin farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamları denenmiştir.

Araştırmada kullanılan MS başlangıç ortamlarının hazırlanması için Sigma firmasının hazır MS besin ortamından 1 lt için gerekli miktar ve büyüme düzenleyicileri alınarak behere aktarılmıştır. Ortama 30 g/L süktroz ilave edilip, hacim destile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Süktroz iyice eritildikten sonra seyreltilmiş NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidrojen klorür) kullanılarak ph=5.8'e ayarlanmıştır. 7 g/L agar ilave edildikten sonra sürekli karıştırılarak berraklaşınca kadar kaynatılan ortamlar, sıcak olarak kapaklı deney tüplerine 10'ar ml olmak üzere dökülmüştür. Ağzıları kapatılan tüpler, otoklavda 121° C'de 15 dakika sterilize edilmişlerdir. Araştırmada kullanılan diğer besin ortamlarının hazırlanması sırasında da aynı işlemler uygulanmıştır.

3.2.2 Bitki eksplantlarının sterilizasyonu ve ön işlemler

GF-677 bitki örnekleri, materyal serasından temin edilerek sterilizasyondan önce bazı ön işlemler yapılmıştır. Bitkilerin yaprakları makasla kesilerek; nod, koltukaltı (aksiller) tomurcuk ve sürgün uçları hazırlanmıştır. Sterilizasyon uygulamaları için, bitki eksplantları beher içinde 5 mg/L fungusitli suda (Benlate) yarım saat bekletilmiş ve ardından eksplantlar steril saf su 2 kez ile durulanmışlardır. Bu işlemin ardından %70'lik etil alkolde 3 dakika tutulmuşlardır ve yine saf su ile 2 kez çalkalanmışlardır. Son olarak %10'luk hypoklorit + 1-2 damla Tween-20 solüsyonu ile 5 dakika steril edildikten sonra saf su ile 3 kez durulanmışlardır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Bitki eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemi.

Uygulama	
Fungusit Uygulaması	5 mg/L, 30 dakika
Etil Alkol Uygulaması	%70'lik, 3 dakika
Hypoklorit (+ 1-2 damla Tween-20) Uygulaması	%10'luk, 5 dakika

3.2.3 Bitki eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması

Bitki eksplantı olarak; sürgün ucu, koltukaltı (aksiller) tomurcuk ve nod kullanılarak 3 tekerrürlü deneme başlatılmıştır. Denemeler, her bir eksplant tipi için, her tekerrürde 15 eksplant olmak üzere 3 tekerrürlü kurulmuştur. Bitki eksplantları başlangıç ortamı olarak 7 g/L agar içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Sterilizasyon prosedürü uygulanan sürgün uçları, koltukaltı tomurcuklar ve nodlar, her bir tüpte bir eksplant bulunacak şekilde, başlangıç ortamlarında kültüre alınmışlardır. Sükroz, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve vitaminlerin içerikleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Eksplant girişinde kullanılan başlangıç ortamı.

Ortam	MS
Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Vitaminler	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA + 1 mg/L MS Vitamin + 0.1 gr Myo- inositol + 0.4 mg/L Thiamine-HCl
Sükroz	30 g/L

3.2.4 Sürgün ucu, koltuklatı tomurcuk ve nod eksplantlarının sürgün gelişimi ortamlarında sürgünlerin elde edilmesi ve çoğaltılması

In vitro koşullarda başlangıç ortamına alınan ve altkültürlemeleri yapılan GF-677 bitki eksplantlarından elde edilen tek nodlu sürgün eksplantları, başlangıç ortamında ve 1. altkültürde her bir tüpte 1 eksplant olacak şekilde, sürgün gelişimi ortamları içeren tüplere; 2., 3., ve 4. altkültürde ise 8-9 bitkicik olacak şekilde, sürgün gelişimi ortamları içeren disposable (tek kullanımlık, plastik kültür kabı) kaplara aktarılmışlardır. İlk 3 altkültürde sürgün çoğalmasında 3 farklı eksplant tipi (sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod) ve 5 farklı MS ortamı kullanılmış ve büyüme parametreleri incelenmiştir. Çalışmaya 4. altkültürden itibaren daha iyi sonuç veren nod eksplantlarıyla devam edilmiştir. Vitrifikasyon için ortam denemeleri kurulmuş ve ortam denemelerinde aktif karbon, phloroglucinol ve agar/gelrite kullanılmıştır. MS besin ortamlarının sükroz, aktif karbon, phloroglucinol, agar/gelrite ve bitki büyüme düzenleyicilerinin içerikleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Çoğaltma ortamlarında 4 haftada bir altkültürleme yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Sürgün gelişimi ve çoğalması için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları.

Ortam	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4	MS 5 (Başlangıç)
Bitki Büyüme Düzenleyicileri	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA	0.1 mg/L GA ₃ + 1 mg/L BAP + 2 mg/L Glycine + 0.02 mg/L NAA
Vitaminler	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L MS-vitamin + 0.4 mg/L Thiamine- HCl	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L MS-vitamin + 0.4 mg/L Thiamine- HCl	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L MS-vitamin + 0.4 mg/L Thiamine- HCl	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L MS-vitamin + 0.4 mg/L Thiamine- HCl	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L MS-vitamin + 0.4 mg/L Thiamine- HCl
Phloroglucinol	-	0,05 g/L	-	-	-
Aktif Karbon	0.1 g/L	-	-	0.1 g/L	-
Sükroz	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Gelrite	-	-	2,7 g/L	2,7 g/L	-
Agar	8 g/L	8 g/L	-	-	7 g/L
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

3.2.5 Nod eksplantlarının kök gelişimi ortamlarında kültüre alınması

Sürgün ucu ve koltukaltı tomurcuk eksplantlarına göre daha iyi gelişme gösteren nod eksplantları, çoğaltma ortamlarında 5 altkültürleme tamamlandıktan sonra, köklendirme ortamlarına alınmışlardır. Kök gelişimi için 9 farklı besin ortam kullanılmış ve büyüme parametreleri incelenmiştir. Ortamlarda IBA'nın 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L konsantrasyonları ile aktif karbon ve phloroglucinol denenmiştir. Kök gelişimi için kullanılan 9 farklı ortamın sükroz, aktif karbon, phloroglucinol ve bitki büyüme düzenleyicilerinin içerikleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Kök gelişimi için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları.

Ortam	KMS 1	KMS 2	KMS 3	KMS 4	KMS 5	KMS 6	KMS 7	KMS 8	KMS 9
Bitki Büyüme Düzenleyicileri	0.5 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	1 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	2 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	0.5 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	1 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	2 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	0.5 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	1 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃	2 mg/L IBA + 1 mg/L GA ₃
Vitaminler	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin	0.1 gr/L Myo-inositol + 1 mg/L Thiamine-HCl + 1 mg/L MS Vitamin
Phloroglucinol	-	-	-	-	-	-	0.05 gr/L	0.05 gr/L	0.05 gr/L
Aktif Karbon	-	-	-	0.1 gr/L	0.1 gr/L	0.1 gr/L	-	-	-
Sükroz	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L	30 gr/L
Agar	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L	8 gr/L
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

3.2.6 Kültür koşulları

Tüm kültürler, floresan ışığında 4000 lux aydınlatma altında, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 25 ± 2°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

3.2.7 Aklimatizasyon ve dış koşullara aktarma

Köklendirme ortamında, 4 hafta sonra köklenen bitkiciklerin dış ortama adaptasyonunu sağlamak amacıyla, disposable kapakları kademeli olarak açılmış ve daha sonra tamamen çıkarılmıştır. Bitkiciklerde büyüme parametreleri incelenmiş ve kök sayımları yapılmıştır. Köklenen bitkicikler, agarlı ortamlardan çıkarılmış ve kökleri besin ortamından temizlenerek torf:perlit:kum (1:1:1) karışımı içeren viollere aktarılmıştır.

3.2.8 İncelenen Özellikler

Araştırmada incelenen büyüme parametreleri sürgün geliştirme aşamasında; canlılık oranı (%), camsılaşmış (vitrifikasyonlu) eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%), kallus oluşturan eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%), çoğalma katsayısı; köklendirme aşamasında ise canlı sürgün sayısı (adet) ve yüzdesi (%), köklenen

sürgün sayısı (adet) ve yüzdesi (%), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet) ve köklenme gün sayısıdır.

3.2.9 Denemenin kurulması ve verilerin değerlendirilmesi

Araştırmamız, GF-677 meyve anacından alınan sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantlarının farklı içerikli MS besin ortamlarında sürgün ve kök gelişimlerinin incelendiği denemeler şeklinde kurulmuştur. Faktör olarak besin ortamlarının ve eksplant çeşidinin ele alındığı denememiz 3 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre oluşturulmuştur. Özellikle daha iyi gelişme gösteren nod eksplantlarının farklı besin ortamlarında verdikleri tepkiler 3 tekerrürlü tesadüf parselleri deneme desenine göre; eksplant tipi ve farklı besin ortamlarının ele alındığı 2 faktörlü ve 3 tekerrürlü tesadüf parselleri deneme desenine göre değerlendirilmiştir (Açıkgöz, 2004).

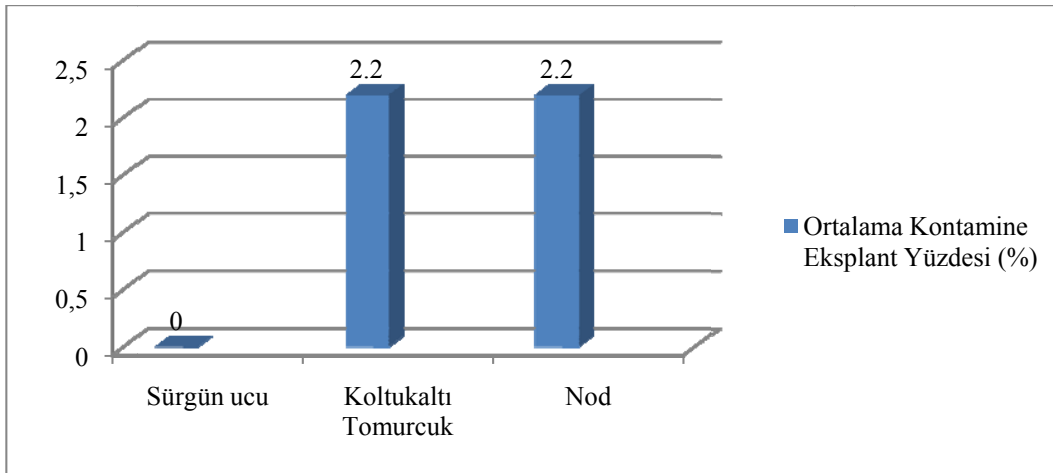
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Başlangıç Besin Ortamında Kültüre Alınan Sürgün Ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod Eksplantlarında Kontaminasyon Durumu

Araştırmada tüm eksplant tiplerinde, 3 tekerrürlü deneme kurulmuş ve her tekerrürde 15 eksplant kullanılmıştır. Sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları arasında kontaminasyon oranları karşılaştırılmıştır. Kullanılan başlangıç ortamında (Çizelge 3.3) görülen kontaminasyon yüzdelerinin ortalamaları Çizelge 4.1’ de ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Başlangıç ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kontamine eksplant sayısı (adet) ve kontamine eksplant yüzdesi (%).

Eksplant Tipi	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Kontamine Eksplant Sayısı (adet)			Kontamine Eksplant Yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.
Sürgün Ucu	15	15	15	-	-	-	0	0	0	0
Koltukaltı Tomurcuk	15	15	15	1	-	-	6.6	0	0	2.2
Nod	15	15	15	1	-	-	6.6	0	0	2.2
Toplam eksplant sayısı			135	Toplam kontamine eksplant sayısı		2	Toplam kontaminasyon oranı			1.4



Şekil 4.1. Başlangıç ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen ortalama kontamine eksplant yüzdesi (%).

In vitro yapılan çalışmalarda, bitki eksplantlarının etkin bir şekilde sterilizasyonun gerçekleşmesi oldukça önem taşımaktadır. Sterilizasyon yöntemleri, anaç bitkinin yetiştiği ortama ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Eksplantlarının yüzeysel sterilizasyonunda kullanılmakta olan en yaygın dezenfektanlar; etanol, kalsiyum, sodyum hipoklorit, gümüş nitrat, hidrojen peroksit ve civa klorürdür. Eksplantın tipi ise (boğum, boğum arası, tohum, sürgün ucu vb.) sterilizasyon yöntemini doğrudan etkilemektedir (Özden, 2007).

Araştırmamızda başlangıç ortamına alınan eksplantlarda önemli bir kontaminasyon sorunu yaşanmamıştır. Koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantlarında kontaminasyon yüzdeleri oldukça düşüktür. Kontamine eksplant yüzdeleri, gerek koltukaltı tomurcuk ve gerekse de nod eksplantlarında ortalama %2.2 olarak belirlenmiştir. Sürgün ucu eksplantlarında kontaminasyon hiç gözlenmemiştir. Bu nedenle, farklı sterilizasyon yöntemlerinin çalışmamızda kullanılan eksplant tiplerinin yüzeysel sterilizasyonunda uygulanmasına gerek olmadığı belirlenmiştir. Eksplantlarda kararmalar oluşmamıştır.

4.2 1. ve 2. Altkültüre Alınan Sürgün Ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod Eksplantlarında Görülen Gelişmeler

Sterilizasyondan sonra başlangıç ortamına alınan eksplantlarda yaklaşık 4 hafta sonra rejenerasyon tepkileri gözlenmiş ve eksplantlar 1. altkültüre alınmışlardır. 1. Altkültürde de başlangıç ortamı (Çizelge 3.3) kullanılmış ve eksplantların canlılık oranlarına ve çoğalma katsayılarına bakılmıştır. Koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantlarında ortalama kontamine eksplant sayısı 0.33 olarak, canlılığını yitiren ortalama eksplant sayısı ise sürgün ucu eksplantlarında 2, koltukaltı tomurcuk eksplantlarında 1.6 olmak üzere Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Nod eksplantlarında canlılığını yitiren eksplant gözlenmemiştir, sürgün ucu eksplantlarında canlılığını yitiren eksplantların yüzdesi ortalama %13.3 iken, koltukaltı tomurcuk eksplantlarında ise bu değer %11.06 olarak bulunmuştur ve değerler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Çoğalma katsayısı; sürgün ucu eksplantlarında ortalama 1.03; koltukaltı tomurcuk eksplantlarında 0.9; nod eksplantlarında ise 2.3'tür (Şekil 4.5). Başlangıç ortamından 1. altkültüre alınan eksplantların durumları Çizelge 4.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Ahmad et. al'ın 2003'te yaptığı bir çalışmada, farklı BA (0.3, 0.6, 0.9 mg/L) Murashige & Skoog (1962) ve Anderson (1984) ortamlarının etkileri

incelenmiştir. MS ortamında sürgün gelişimi uzaması en iyi iken, AND ortamındaki sürgünler klorotik, küçük ve camsı (vitriifiye) bulunmuşlardır. BAP'ın daha yüksek seviyesi (0.9 mg/L) ise kallus oluşumunu ve sürgün apikal nekrozunu teşvik etmiştir (Ahmad et al., 2003). Doku kültüründe vitrifikasyon önemli bir sorun teşkil etmektedir. Vitrifikasyon (camsılaşma) nedenleri; osmozun bozulması, besin ortamının çok fazla sitokinin içermesi, hücre duvarında lignin eksikliği, yanlış agar kullanımı ve kültürün yaşlanmasıdır. Çözüm olabilecek öneriler ise; sıcaklığı düşürme, havalandırmayı ve agar miktarını arttırma, sitokinin azaltılması, phloroglucinol ilavesi, agar tipini değiştirme ve daha sık transfer yapılması olarak belirlenmiştir (Şenyay, 2008).

Bu çalışmada da, eksplantlar 2. altkültüre alınırken, sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantlarının çoğalma katsayılarında artış görülürken, bazı eksplantlarda vitrifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.2 a ve b). Sürgün ucu eksplantlarında çoğalma katsayısı ortalama 3.4 iken, vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %15.03; koltukaltı tomurcuk eksplantlarında çoğaltma katsayısı ortalama 2.1 iken, vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %14.6; nod eksplantlarında çoğalma katsayısı ortalama 4.1 iken, vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %22.1'dir (Çizelge 4.3); (Şekil 4.7); (Şekil 4.8). Sürgün ucu eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ortalama %27.8 iken, koltukaltı tomurcuk eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ortalama %29.4'tür ve nod eksplantlarında kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.3); (Şekil 4.6); (Şekil 4.7).



(a)



(b)

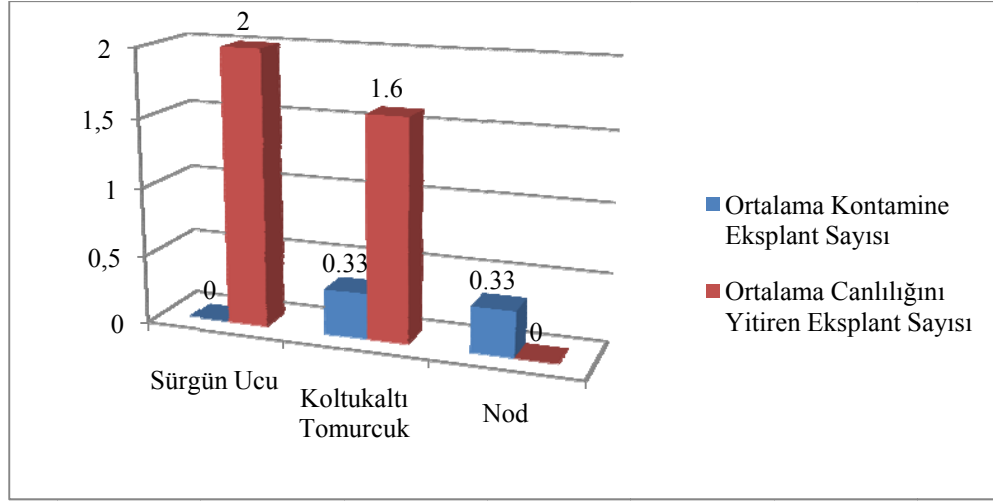
Şekil 4.2. (a) Nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyon durumu (b) Koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen vitrifikasyon durumu

Eksplantlar 3. altkültüre alınırken 5 farklı MS besin ortamı (Çizelge 3.4) denenmiş, eksplantların MS besin ortamlarında gösterdikleri gelişmeler incelenmiştir. Çoğalmayı teşvik etmek ve vitrifikasyonu önlemek amacıyla; agar miktarı arttırılmış, başlangıç ortamında (MS 5) 7 g/L agar kullanılır iken; MS 1 besin ortamında 8 g/L agar ve 0.1 g/L aktif karbon, MS 2 besin ortamında ise 8 g/L agar ve 0.05 g/L phloroglucinol kullanılmıştır. MS 3 besin ortamında gelrite (2.7 g/L) denenirken MS 4 besin ortamında ise gelrite (2.7 g/L) ve 0.1 g/L aktif karbon denenmiştir.

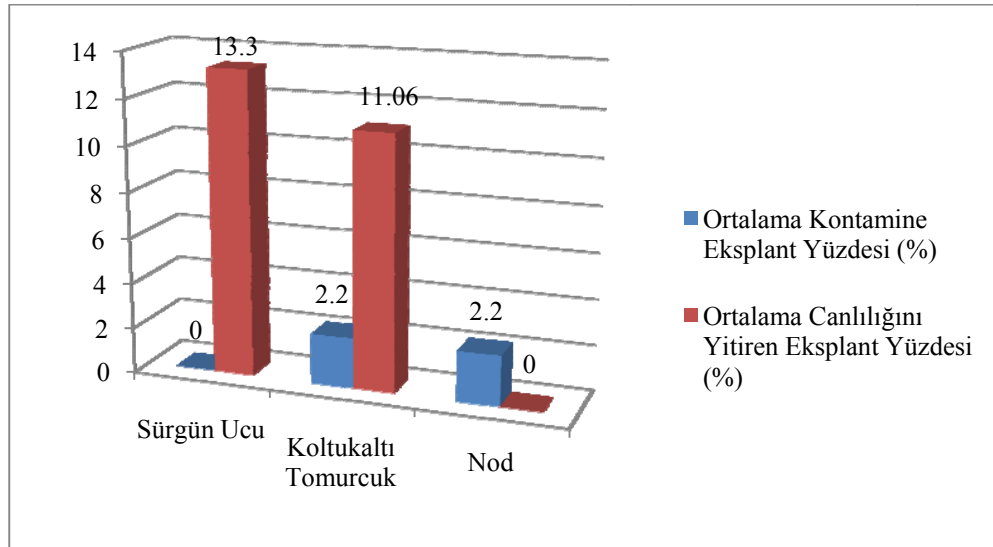
Eksplantlar başlangıç ortamında ve 1. altkültürde cam tüplere konulmuştur. 2. Altkültürden itibaren disposable kaplara transfer edilmişlerdir. Cam tüplerde kültüre alındıklarında, eksplantlarda terlemenin daha az olduğu gözlenmiştir. Disposable kaplarda altkültürleme yapıldığında, kap içerisinde fazla oranda etilen birikimi gözlenmiş ve terleme oranı artmıştır. Marino ve Ventura'nın 1997'de (Marino and Ventura, 1997) yaptığı benzer bir çalışmada, hava geçirmez kapak kullanımının etilen birikimini hızlandırdığı ve sürgünlerin köklenme süresini azaltabildiği ispatlanmıştır. Bununla birlikte, köklenme periyodunun sonuna doğru serbest gaz değişiminin, yaprak sararmasını önlemek için tavsiye edilebileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda ise kullanım kolaylığı ve pratikliği açısından disposable kaplar tercih edilmiştir.

Çizelge 4.2. 1. Altkültürde eksplantlarda gözlenen kontamine eksplant sayısı (adet), kontamine eksplant yüzdesi (%), canlılığı yitiren eksplant sayısı (adet), canlılığı yitiren eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

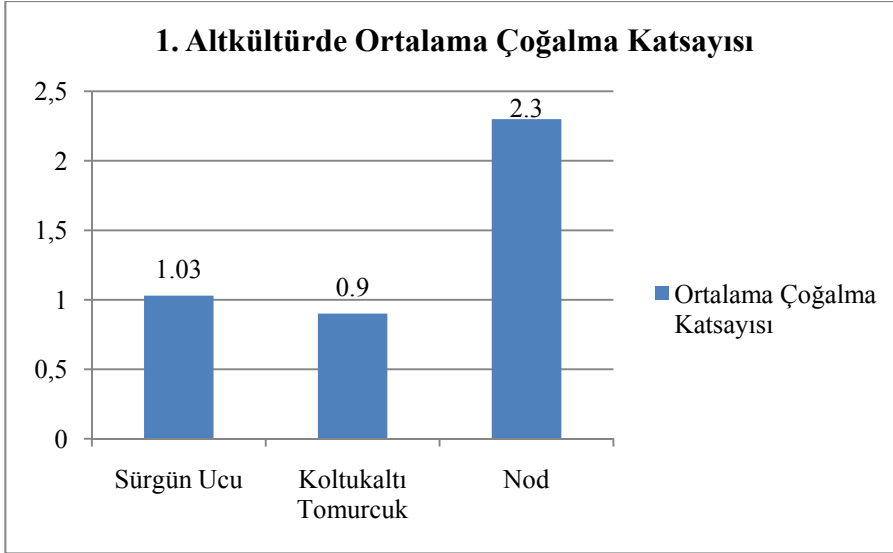
Eksplant Tipi	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Kontamine Eksplant Sayısı (adet)			Kontamine Eksplant Yüzdesi (%)			Canlılığı Yitiren Eksplant Sayısı (adet)			Canlılığı Yitiren Eksplant Yüzdesi (%)			Çoğalma Katsayısı		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Sürgün Ucu	15	15	15	-	-	-	0	0	0	-	1	5	0	6.6	33.3	13.3	0.9	0.6
Koltukaltı Tomurcuk	15	15	15	1	-	-	6.6	0	0	1	-	4	6.6	-	26.6	11.06	1.2	0.7
Nod	15	15	15	1	-	-	6.6	0	0	-	-	-	-	-	-	2.3	2.5	2.2
Toplam eksplant sayısı	135			2			Toplam kontaminasyon oranı			Canlılığı Yitiren Toplam Eksplant Sayısı			Canlılığı Yitiren Toplam Eksplant Oranı			F=15.686; LSD=1.034; HKO=0.117; p<0.01		



Şekil 4.3. 1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama kontamine eksplant sayısı ve ortalama canlılığını yitiren eksplant sayısı.



Şekil 4.4. 1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama kontamine eksplant yüzdesi (%) ve ortalama canlılığını yitiren eksplant yüzdesi (%).

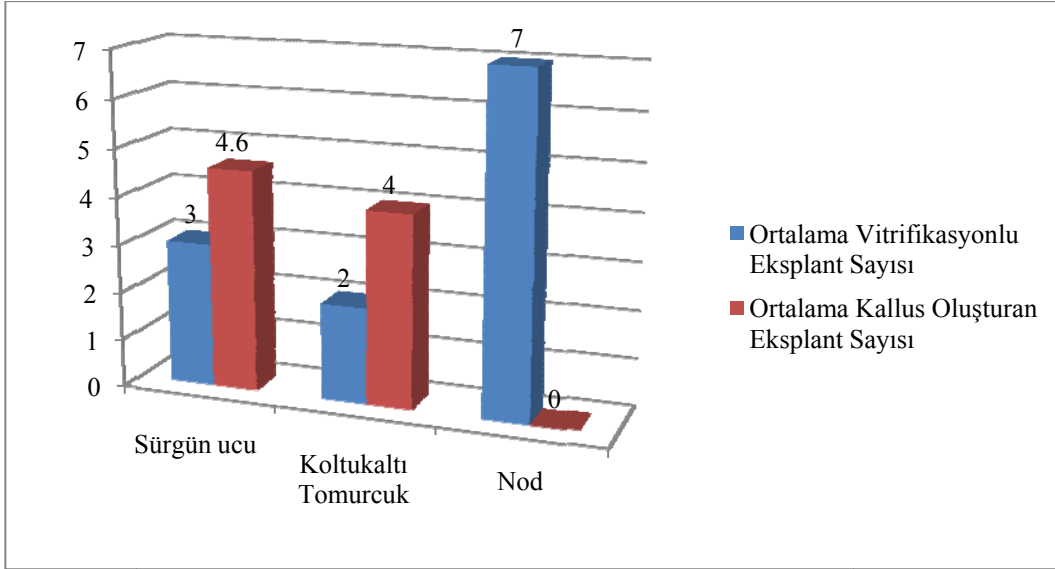


Şekil 4.5. 1. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama çoğalma katsayıları.

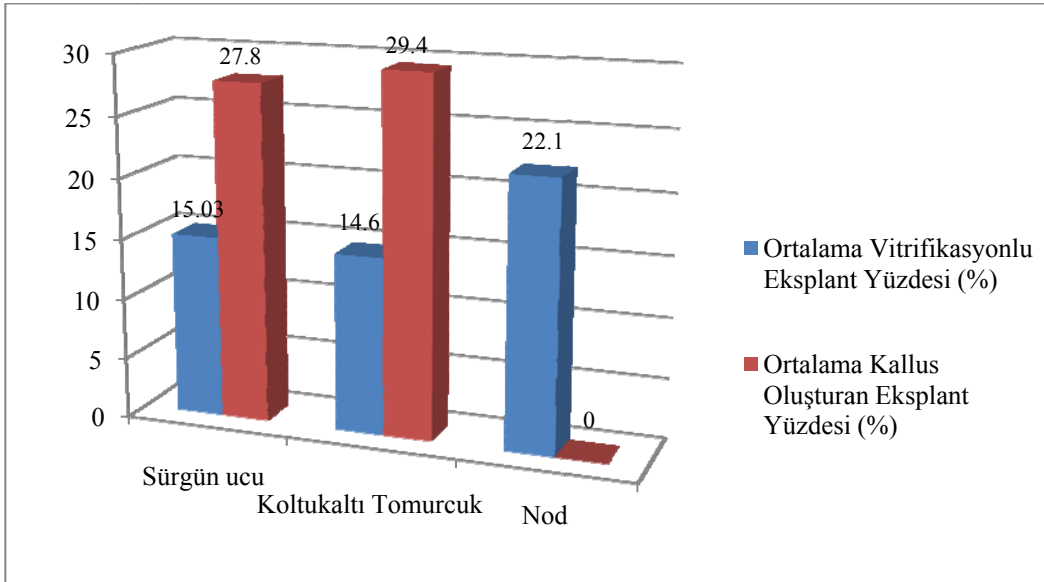
1. Altkültürde kültüre alınan sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları arasında yapılan istatistiksel analize göre; canlılığını yitiren eksplant yüzdesi bakımından eksplant çeşitleri arasındaki fark önemli bulunmazken ($F=0.010$); çoğalma katsayısı bakımından eksplant çeşitleri arasındaki fark %1 seviyesinde önemli bulunmuştur ($F=15.686$). Çoğalma katsayısı bakımından, eksplantlarda ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde nod eksplantları (2.33) birinci grupta; sürgün ucu (1.03) ve koltukaltı tomurcuk (0.93) eksplantları ikinci grupta yer almışlardır ($HKO=0.117$; $LSD=1.034$);(Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. 2. Altkültürde eksplantlarda gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%), kallus oluşturan eksplant sayısı (adet), kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

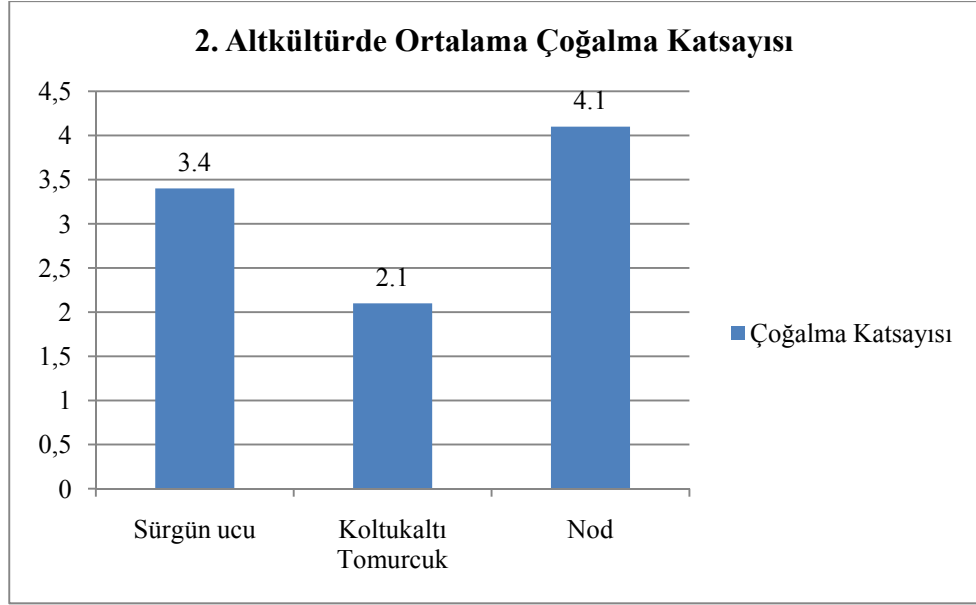
Eksplant Tipi	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %			Kallus Oluşturan Eksplant Sayısı (adet)			Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi %			Çoğalma Katsayısı		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Sürgün Ucu	25	14	10	7	1	1	28	7.1	10	15.03	8	3	3	27.8	32	21.4	30	27.8
KoltukaltıTomurcuk	14	18	11	-	3	3	-	16.6	27.2	14.6	7	2	3	29.4	50	11.1	27.2	29.4
Nod	32	30	34	7	9	5	21.8	30	14.7	22.1	-	-	-	-	-	-	-	2.6
Toplam Eksplant Sayısı	188			Toplam Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı			Toplam Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi			19.1	Toplam Kallus Oluşturan Eksplant Sayısı			13.8	Toplam Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi			



Şekil 4.6. 2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant sayısı ve ortalama kallus oluşturan eksplant sayısı.



Şekil 4.7. 2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve ortalama kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%).



Şekil 4.8. 2. Altkültürde eksplant tiplerinde gözlenen ortalama çoğalma katsayıları.

2. Altkültürde kültüre alınan sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları arasında yapılan istatistiksel analize göre; vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ($F=0.589$), kallus oluşturan eksplant yüzdesi ($F=0.007$) ve çoğalma katsayısı ($F=2.394$) bakımından eksplant çeşitleri arasındaki farklar önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3).

4.2.1 3., 4. ve 5. Altkültür için farklı MS besin ortamlarına alınan Sürgün ucu, Koltukaltı Tomurcuk ve Nod eksplantlarında görülen gelişmeler

Eksplantların 2. altkültüre transferleri yapıldıktan yaklaşık 4 hafta sonunda, MS besin ortamlarına bakılmış ve gelişmeler not edilmiştir. Sürgün ucu eksplantlarında ve koltukaltı tomurcuk eksplantlarında çoklu sürgün oluşturma oranının düşük olduğu, vitrifikasyondan dolayı eksplantların çok iyi gelişemediği gözlenmiştir.

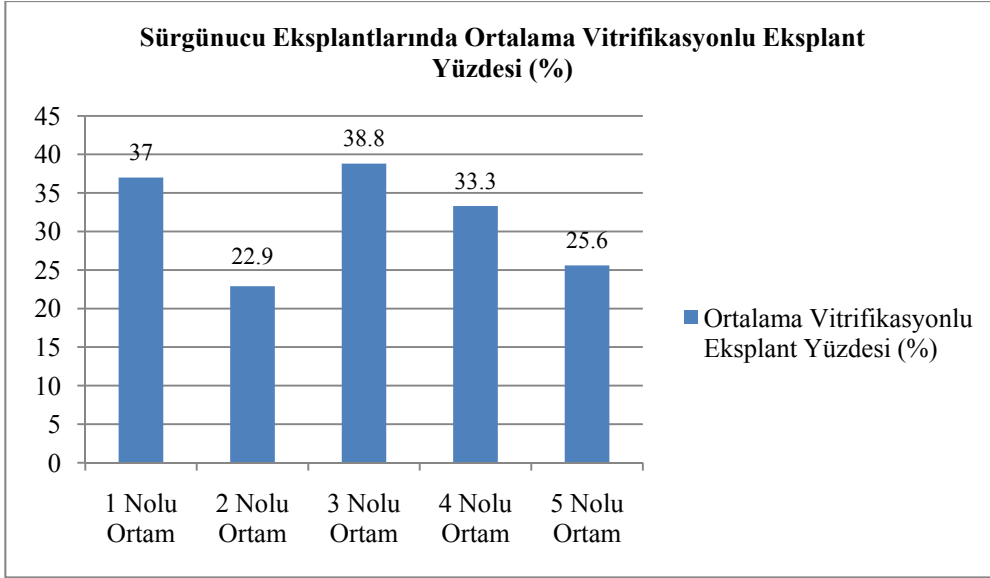
Sürgün ucu eksplantlarında 1 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %37, çoğalma katsayısı ortalama 2.5; 2 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %22.9, çoğalma katsayısı ortalama 3.4; 3 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %38.8, çoğalma katsayısı ortalama 3.1; 4 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi

ortalama %33.3, çoğalma katsayısı ortalama 2.7; 5 no'lu besin ortamda (başlangıç ortamı) vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %25.6, çoğalma katsayısı ortalama 2.5'tir (Çizelge 4.4); (Şekil 4.9); (Şekil 4.10). 1 no'lu besin ortamında, eksplantlarda vitrifikasyondan dolayı sararma gözlenmiştir, eksplant yaprakları uzun ve yeşildir. 2 no'lu besin ortamında, eksplant boyları 1 no'lu besin ortamına göre daha uzundur. Eksplant yaprakları ise kısa ve yeşildir, fakat vitrifikasyondan dolayı kıvrıktır. 3 no'lu besin ortamında eksplant boyları uzundur, vitrifikasyondan dolayı eksplant yaprakları sarımsı renktedir ve yapraklarda kıvrıkcıklaşma gözlenmiştir. 4 no'lu besin ortamında eksplant yaprakları uzun ve yeşildir, fakat vitrifikasyondan dolayı yapraklarda kıvrıkcıklaşma meydana gelmiştir. Eksplant boyları kısadır. 5 no'lu besin ortamında eksplant boyları uzundur, vitrifikasyondan dolayı yapraklar sarımsı renkte gözlenmiştir.

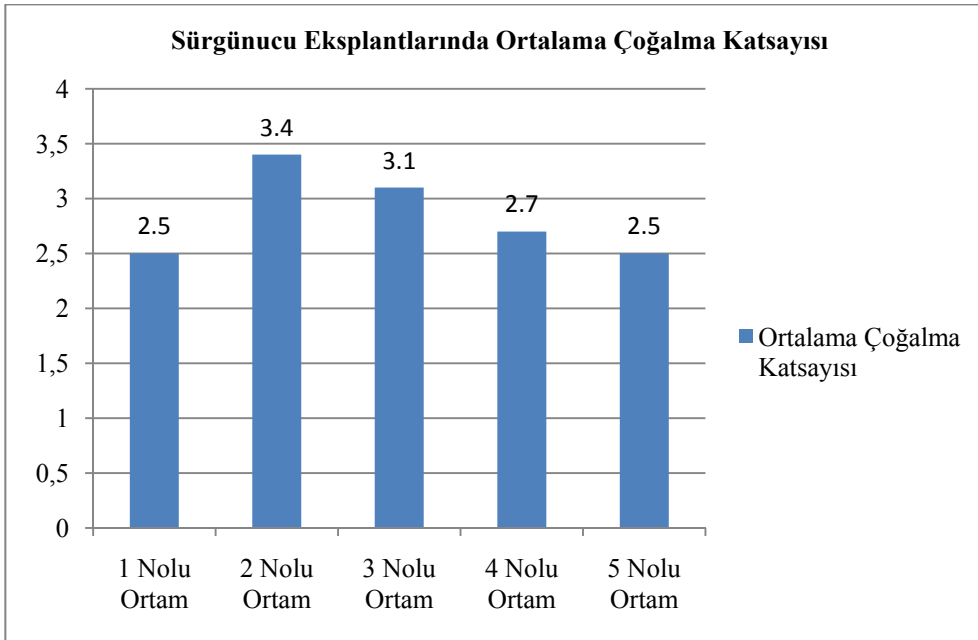
Koltukaltı tomurcuk eksplantlarında 1 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %10, çoğalma katsayısı ortalama 2.5; 2 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %28.8, çoğalma katsayısı ortalama 3.3; 3 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %64.4, çoğalma katsayısı ortalama 2.1; 4 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %40, çoğalma katsayısı ortalama 2.4; 5 no'lu besin ortamında (başlangıç ortamı) vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %34.4, çoğalma katsayısı ortalama 2.7'dir (Çizelge 4.5); (Şekil 4.11); (Şekil 4.12). 1 no'lu besin ortamında, vitrifikasyon diğer ortamlara göre daha az oluşmuştur. Eksplant yaprakları uzun ve yeşildir. 2 no'lu besin ortamında yapraklar uzun ve yeşil, eksplant boyları daha uzundur ve 3 no'lu besin ortamında eksplantlarda en yüksek oranda vitrifikasyon gözlenmiştir, vitrifikasyondan dolayı yapraklar sarımsı renktedir ve kıvrıkcıklaşmıştır. 4 no'lu besin ortamında vitrifiye olan eksplant yaprakları yine vitrifikasyondan dolayı sararmıştır. 5 no'lu besin ortamında eksplant boyları uzundur, vitrifikasyondan dolayı eksplant yapraklarında sararma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.4. 3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

Besin Ortamları	Sürgün ucu Eksplantları															
	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)						Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %				Çoğalma Katsayısı		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.		
1 No'lu Ortam	9	9	6	4	3	2	44.4	33.3	33.3	37	2.6	2.4	2.7	2.5		
2 No'lu Ortam	16	16	8	3	4	2	18.75	25	25	22.9	3.2	3.4	3.8	3.4		
3 No'lu Ortam	9	9	6	2	4	3	22.2	44.4	50	38.8	3.1	2.8	3.4	3.1		
4 No'lu Ortam	9	9	6	3	3	2	33.3	33.3	33.3	33.3	2.5	3.2	2.4	2.7		
5 No'lu Ortam (Başlangıç Ortamı)	16	16	6	3	4	2	18.75	25	33.3	25.6	2.8	2.6	2.1	2.5		



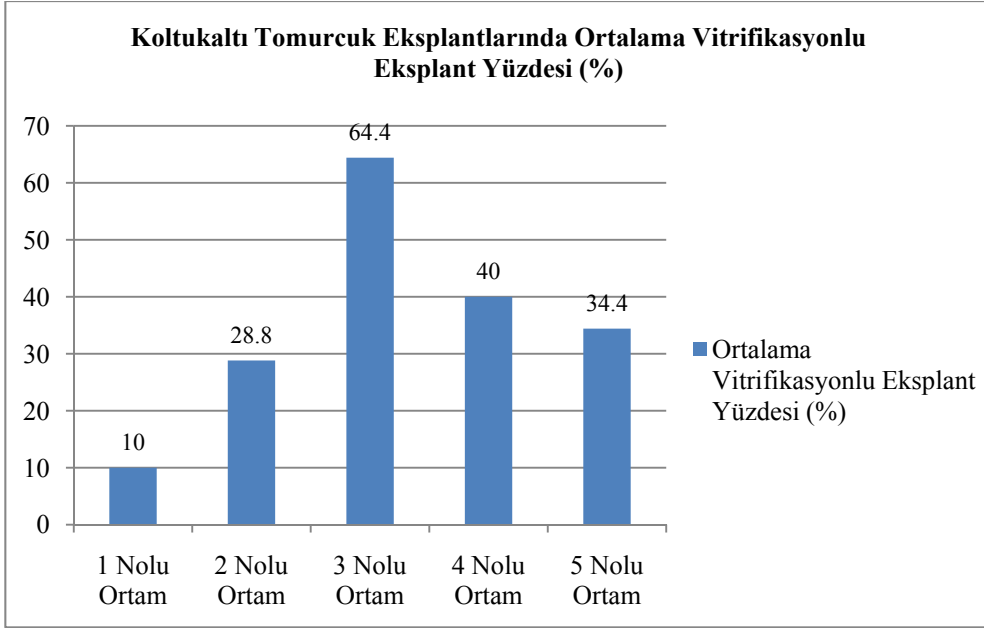
Şekil 4.9. 3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).



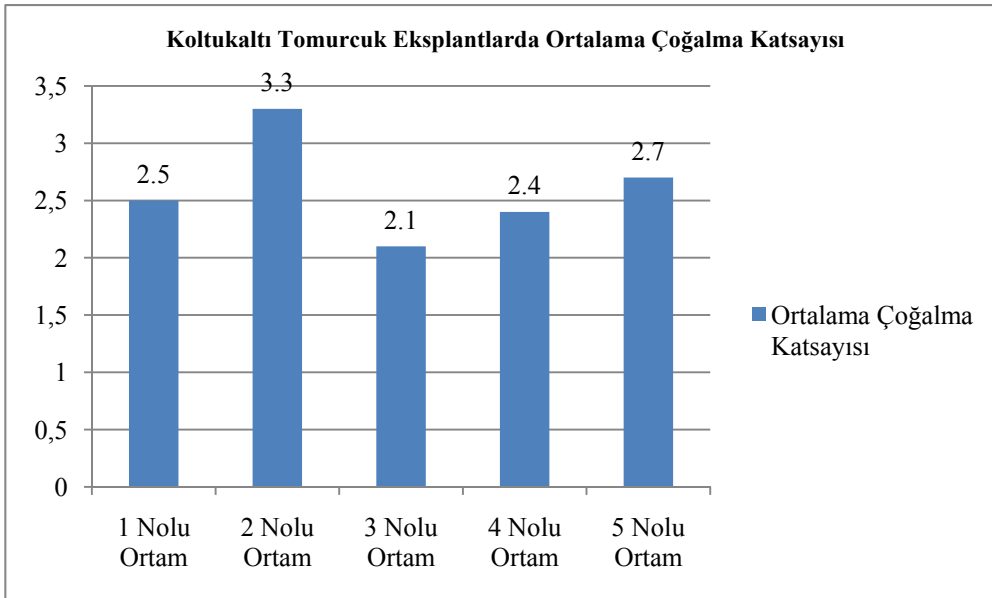
Şekil 4.10. 3. Altkültürde sürgün ucu eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı.

Çizelge 4.5. 3. Altkültürde koltukaltı tomurcek eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

Koltukaltı Tomurcuk Eksplantları														
Besin Ortamları	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı(adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %			Çoğalma Katsayısı				
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	
1 No'lu Ortam	2	10	5	-	1	1	-	10	20	10	2.5	2.6	2.4	2.5
2 No'lu Ortam	3	10	6	1	2	2	33.3	20	33.3	28.8	3.2	3.5	3.2	3.3
3 No'lu Ortam	2	9	5	2	3	3	100	33.3	60	64.4	2	2.4	2	2.1
4 No'lu Ortam	2	10	5	1	3	2	50	30	40	40	2	2.6	2.6	2.4
5 No'lu Ortam (Başlangıç Ortamı)	3	10	5	1	3	2	33.3	30	40	34.4	2.5	2.6	3	2.7



Şekil 4.11. 3. Altkültürde koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).



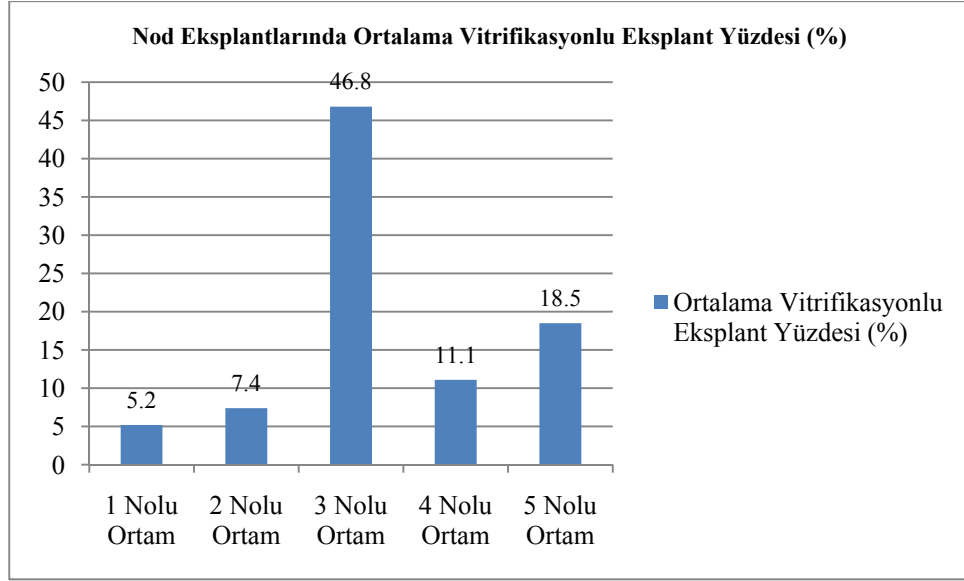
Şekil 4.12. 3. Altkültürde koltukaltı tomurcuk eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı.

Nod eksplantlarında ise çoğalma katsayısı daha fazla olması ile birlikte vitrifikasyon oranının da az olduğu görülmüştür. Nod eksplantlarında 1 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %5.2, çoğalma katsayısı ortalama 4.9; 2 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %7.4, çoğalma katsayısı ortalama 5.5; 3 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %46.8, çoğalma katsayısı ortalama 3.7; 4 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %11.1, çoğalma katsayısı ortalama 3; 5 no'lu besin ortamında (başlangıç ortamı) vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %18.5, çoğalma katsayısı ortalama 5.5'tir (Çizelge 4.6); (Şekil 4.13); (Şekil 4.14). 1 No'lu besin ortamında, eksplant yaprakları uzun ve yeşildir, kallus oluşumları azdır. 2 No'lu besin ortamında eksplant yaprakları kısa ve yeşildir, 1 no'lu besin ortamındaki eksplantlara göre boyları daha uzundur ve kallus oluşumları fazladır. 3 No'lu besin ortamında eksplant boyları uzundur, vitrifikasyondan dolayı yapraklar sarımsı renktedir ve kallus oluşumları fazladır. 4 No'lu besin ortamında yapraklar uzun ve yeşildir, eksplant boyları kısa ve kallus oluşumu azdır. 5 No'lu besin ortamında eksplant boyları uzundur, vitrifikasyondan dolayı yapraklar sarımsı renktedir ve kallus oluşumları fazladır.

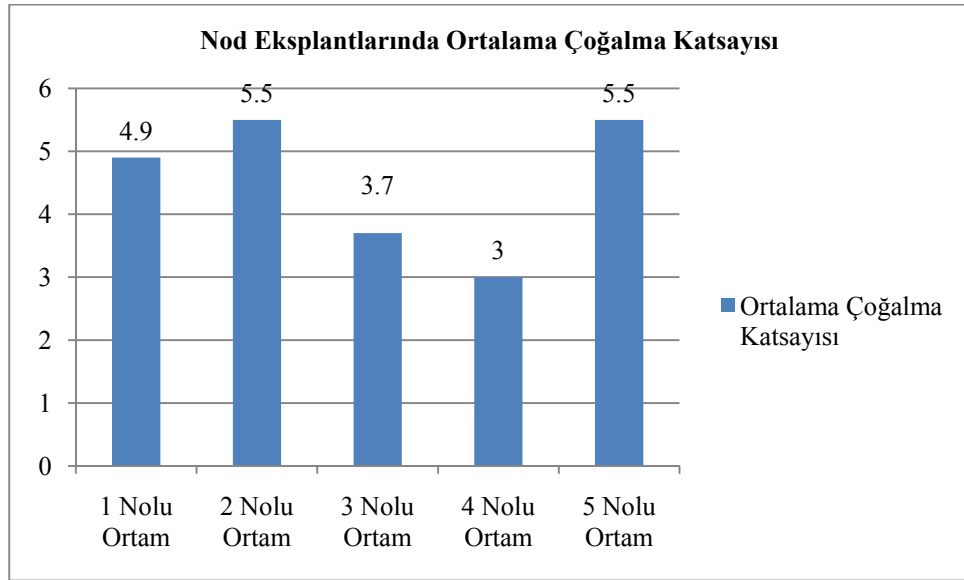
Sürgün ucu ve koltukaltı tomurcuk eksplantlarının çoğalma katsayıları nod eksplantlarına göre daha düşüktür ve bu eksplantların besin ortamlarındaki gelişimleri nod eksplantlarına göre daha yavaştır. Çalışmaya 3. altkültürden sonra, çoğalma katsayısı daha fazla olan ve fizyolojik görünümü daha iyi olan nod eksplantları ile devam edilmiştir. Çoğalma katsayısının fazla, vitrifikasyonlu eksplant yüzdesinin düşük olduğu 1 ve 2 no'lu besin ortamlarında ve başlangıç ortamı olan 5 no'lu ortamda nod eksplantları kültüre alınmışlardır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.6. 3. Alıkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

Nod Eksplantları																
Besin Ortamları	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %			Çoğalma Katsayısı						
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3
1 No'lu Ortam	18	27	36	-	2	3	-	7.4	8.3	5.2	4.5	5.7	4.5	4.9		
2 No'lu Ortam	18	36	36	-	4	4	-	11.1	11.1	7.4	4	7.6	5	5.5		
3 No'lu Ortam	18	27	27	10	12	11	55.5	44.4	40.7	46.8	3.4	3.7	4	3.7		
4 No'lu Ortam	9	27	27	-	9	-	-	33.3	-	11.1	2.6	3.2	3.2	3		
5 No'lu Ortam (Başlangıç Ortamı)	18	27	36	-	9	8	-	33.3	22.2	18.5	4	8	4.5	5.5		



Şekil 4.13. 3. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).



Şekil 4.14. 3. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı.

Çizelge 4.7. 3. Altkültürde vitrifikasyonlu eksplant yüzdeleri bakımından ve çoğalma katsayıları bakımından besin ortamlarının karşılaştırılması.

Besin Ortamları	Çoğalma Katsayıları Ortalamaları*	Vitrifikasyon**
1 No'lu Ortam	3.322 AB	22.386 B
2 No'lu Ortam	4.100 A	22.194 B
3 No'lu ortam	2.978 B	50.056 A
4 No'lu ortam	2.700 B	36.171 AB
5 No'lu ortam	3.567 AB	29.481 B
*F=4.069; LSD=1.043; HKO=0.647; p<0.01		
**F=7.721; LSD=18.059; HKO=145.897 p<0.01		

3. Altkültürde 5 farklı besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları arasında yapılan istatistiksel analize göre; vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi bakımından besin ortamları arasında (F=7.721) %1 seviyesinde fark gözlenirken, eksplantlar (F=2.681) ve besin ortamı × eksplant interaksyonu (F=1.711) arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Vitrifikasyonlu eksplant yüzdeleri bakımından ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 3 (50.05) no'lu ortam birinci grupta; 4 (36.17) no'lu ortam ikinci grupta; 5 (29.48) , 1 (22.38) ve 2 (22.19) no'lu ortamlar üçüncü grupta yer almışlardır (HKO=145.897; LSD=18.059); (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. 3. Altkültürde Çoğalma katsayısı bakımından eksplant tiplerinde ortalamaların karşılaştırılması.

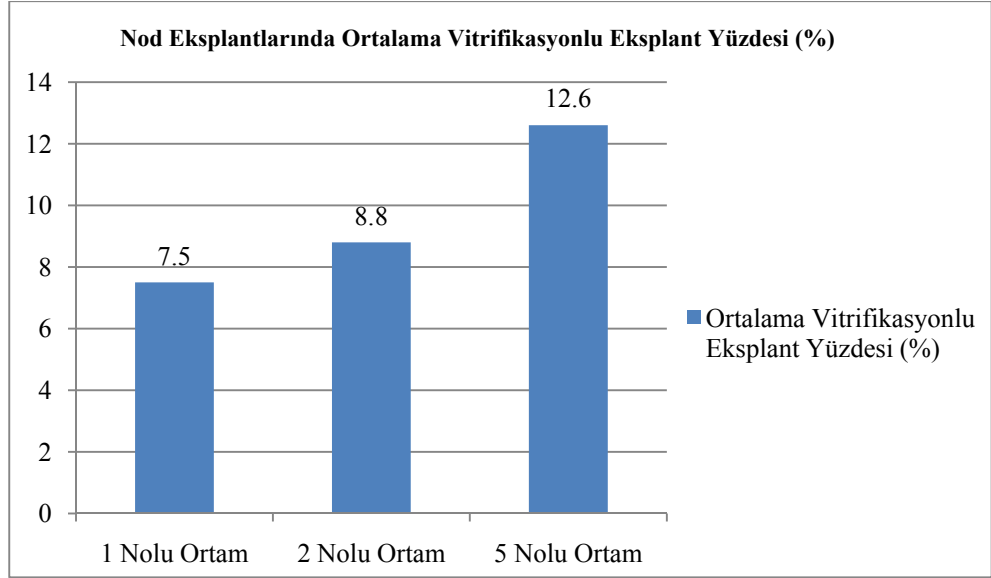
Eksplant Tipi	Çoğalma Katsayıları Ortalamaları
Sürgün Ucu	2.867 B
Koltukaltı Tomurcuk	2.607 B
Nod	4.527 A
F=25.157; LSD=0.808; HKO=0.647; p<0.01	

3. Altkültürde 5 farklı besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları arasında yapılan istatistiksel analize göre; çoğalma katsayısı bakımından besin ortamları arasında (F=4.069) %1 seviyesinde fark, eksplantlar arasında (F=25.157) %1 seviyesinde fark gözlenirken; besin ortamı ×

eksplant interaksyonu ($F=1.762$) arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Çoğalma katsayısı bakımından, besin ortamlarında ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 2 (4.10) no'lu ortam birinci grupta; 5 (3.56) ve 1 (3.32) no'lu ortamlar ikinci grupta; 3 (2.97) ve 4 (2.70) no'lu ortamlar üçüncü grupta yer almışlardır ($HKO=0.647$; $LSD=1.043$); (Çizelge 4.7). Çoğalma katsayısı bakımından, eksplantlarda ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde nod eksplantları (4.52) birinci grupta; sürgün ucu (2.86) ve koltukaltı tomurcuk (2.60) eksplantları ikinci grupta yer almışlardır ($HKO=0.647$; $LSD=0.808$); (Çizelge 4.8).

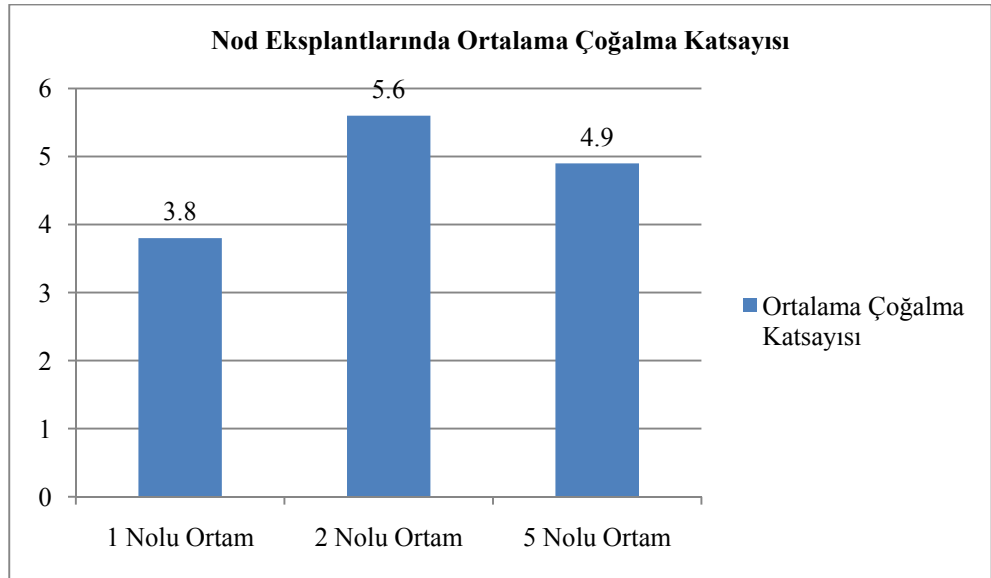
Çizelge 4.9. 4. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı(adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

Nod Eksplantları														
Besin Ortamları	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %			Çoğalma Katsayısı				
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1 No'lu Ortam	72	135	160	6	10	11	8.3	7.4	6.8	7.5	3.6	4.5	3.4	3.8
2 No'lu Ortam	64	207	162	8	18	9	12.5	8.6	5.5	8.8	4.2	7.3	5.4	5.6
5 No'lu Ortam	64	192	144	12	17	15	18.7	8.8	10.4	12.6	3.8	6.8	4.2	4.9



Şekil 4.15. 4. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).

4. Altkültürde 3 farklı besin ortamına alınan eksplantların, vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi yapılan istatistiksel analize göre önemli bulunmamıştır ($F=1.547$);(Çizelge 4.9).

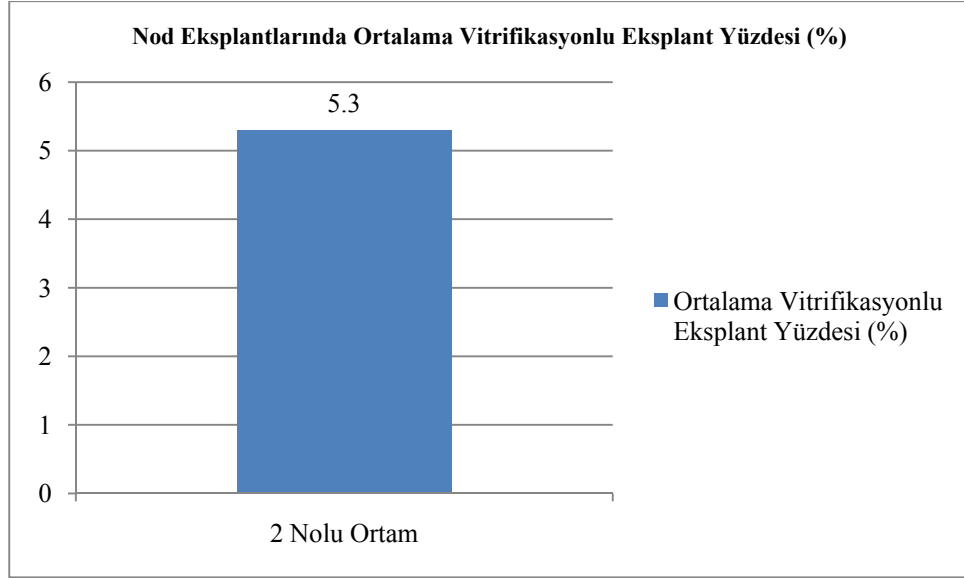


Şekil 4.16. 4. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı.

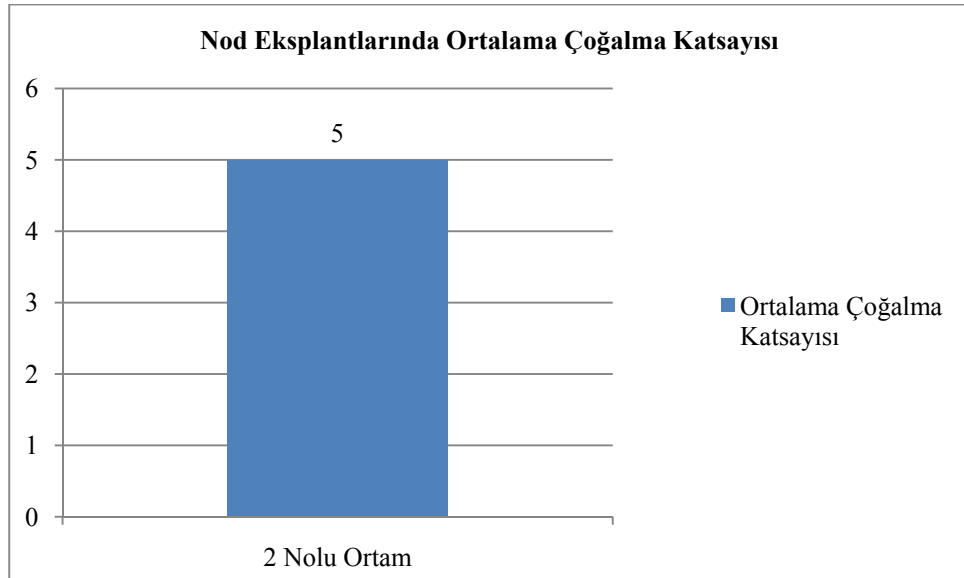
4. Altkültürde 3 farklı besin ortamına alınan eksplantların, çoğalma katsayısı yapılan istatistiksel analize göre önemli bulunmamıştır ($F=1.362$);(Çizelge 4.9).

Çizelge 4.10. 5. Altkültürde nod eksplantlarında gözlenen vitrifikasyonlu eksplant sayısı (adet), vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%) ve çoğalma katsayısı.

Besin Ortamı	Nod Eksplantları													
	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Sayısı (adet)			Vitrifikasyonlu Eksplant Yüzdesi %			Çoğalma Katsayısı				
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
	215	1413	791	18	44	37	8.3	3.1	4.6	5.3	3.8	6.4	4.8	5
2 No'lu Ortam														



Şekil 4.17. 5. Altkültürde 2 no'lu besin ortamında nod eksplantlarında gözlenen ortalama vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi (%).



Şekil 4.18. 5. Altkültürde 2 no'lu besin ortamında nod eksplantlarında gözlenen ortalama çoğalma katsayısı.

4. Altkültürlemede 1,2 ve 5 no'lu besin ortamlarına alınan eksplantlarda 4 hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda farklı gelişimler gözlenmiştir. 4. Altkültürde nod eksplantlarında, 1 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %7.5, çoğalma katsayısı ortalama 3.8; 2 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %8.8, çoğalma katsayısı ortalama 5.6; 5 no'lu besin ortamında (başlangıç ortamı) vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %12.6, çoğalma katsayısı ortalama 4.9'dur (Çizelge 4.9); (Şekil 4.15); (Şekil 4.16). 1 no'lu besin ortamında sürgün yaprakları uzun ve koyu yeşil renktedir, kallus oluşumları azdır ve bazı sürgünlerde kök gelişimleri gözlenmiştir. 2 no'lu besin ortamında kallus oluşumunun fazla olması ile birlikte sürgün boyları uzun ve yaprakları yeşil renkte gözlenmiştir. 5 no'lu besin ortamında ise, kallus oluşumu fazla, sürgün boyları uzun fakat vitrifikasyondan dolayı bazılarında sararma meydana gelmiştir.

Sürgünlerde görülen gelişmeler ve çoğalma katsayısının fazla olması nedeniyle 5. Altkültürde sürgünler 2 no'lu besin ortamına alınmıştır ve 4 hafta sonra yapılan gözlemler kaydedilmiştir. 5. Altkültürde 2 no'lu besin ortamında vitrifikasyonlu eksplant yüzdesi ortalama %5.3; çoğalma katsayısı ortalama 5'tir (Çizelge 4.10); (Şekil 4.17); (Şekil 4.18). Bu altkültürde eksplant boyları uzun ve kallus oluşumu fazladır. Vitrifikasyonun diğer altkültürlere göre azaldığı gözlenmiştir.

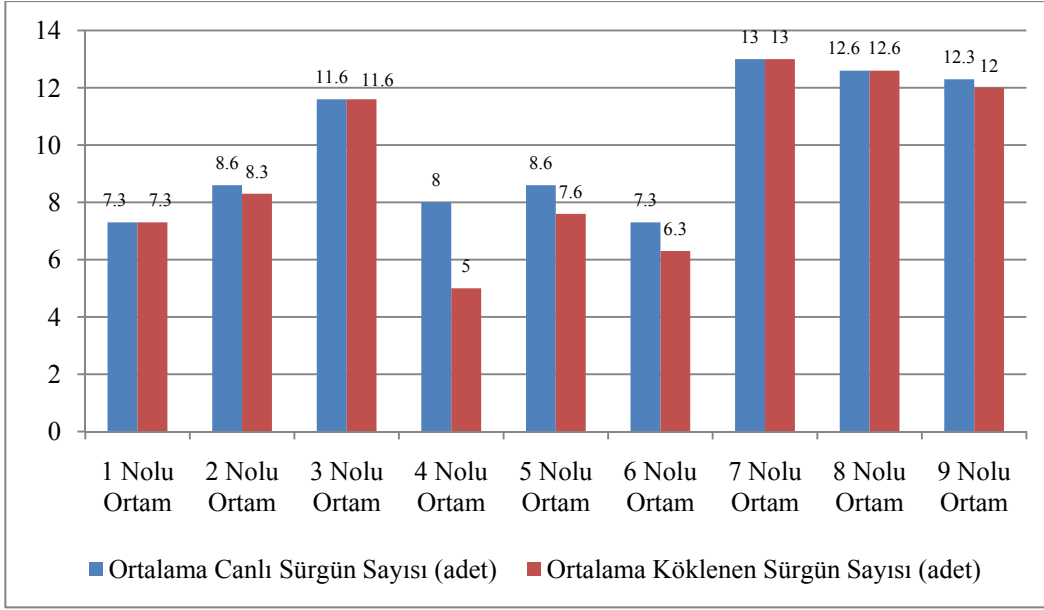
Bu aşamadan sonra sürgünler kök ortamlarına aktarılmışlardır.

4.3 *In vitro* kök gelişimi

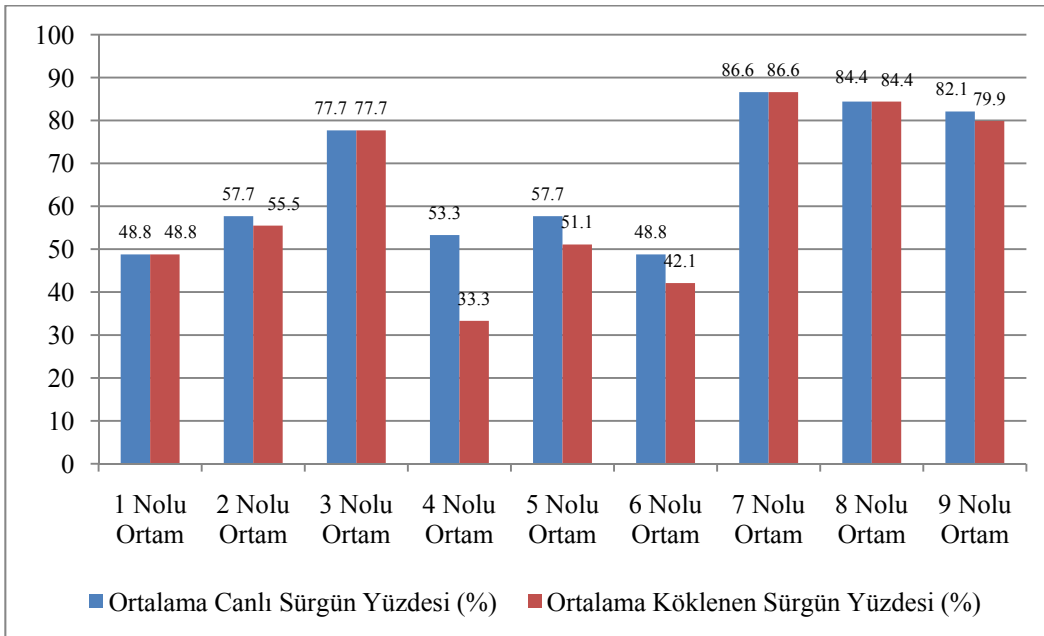
Araştırmada, çoğaltma besin ortamları denemelerinden sonra sürgünler kök ortamlarına alınmışlardır. Kök oluşumu için yapılan denemelerde aktif karbon, phloroglucinol bulunan ve büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları bakımından farklı 9 MS ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Sürgünler, yine 3 tekerrürlü 15'er eksplant olarak 0,5 mg/l IBA, 1 mg/l IBA, 2 mg/l IBA içeren, aktif karbon ve phloroglucinol bulunan besin ortamlarına aktarılmıştır. 1, 2, 3, 5, 7, 9 no'lu MS besin ortamlarında 15 gün sonra ilk kök oluşumları gözlenmiştir. 4 hafta sonra eksplantların canlılık oranlarına, köklenen eksplant sayısına, canlı eksplantlarda oluşan kök sayılarına ve ortalama bitkicik boyuna bakılarak gözlemler yapılmıştır. 9 farklı MS ortamında, ortamlarda bulunan canlı sürgün sayısı (adet), canlı sürgün yüzdesi (%), köklenen sürgün sayısı (adet), köklenen sürgün yüzdesi (%) belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Köklendirme ortamlarında kültüre alınan *in vitro* sürgünlerde gözlenen canlı sürgün sayısı (adet), canlı sürgün yüzdesi (%), köklenen sürgün sayısı (adet), köklenen sürgün yüzdesi (%).

Besin Ortamları	Sürgünler															
	Kültüre Alınan Sürgün Sayısı (adet)				Canlı Sürgün Sayısı (adet)				Canlı Sürgün Yüzdesi %				Köklenen Sürgün Sayısı (adet)			
	T1	T2	T3		T1	T2	T3		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1 No'lu Ortam	15	15	15		5	9	8		33.3	60	53.3	48.8	5	9	8	48.8
2 No'lu Ortam	15	15	15		11	7	8		73.3	46.6	53.3	57.7	11	6	8	55.5
3 No'lu Ortam	15	15	15		10	14	11		66.6	93.3	73.3	77.7	10	14	11	77.7
4 No'lu Ortam	15	15	15		7	8	9		46.6	53.3	60	53.3	6	3	6	33.3
5 No'lu Ortam	15	15	15		5	10	11		33.3	66.6	73.3	57.7	5	9	9	51.1
6 No'lu Ortam	15	15	15		4	10	8		26.6	66.6	53.3	48.8	4	8	7	42.1
7 No'lu Ortam	15	15	15		11	14	14		73.3	93.3	93.3	86.6	10	14	15	86.6
8 No'lu Ortam	15	15	15		12	12	14		80	80	93.3	84.4	12	12	14	84.4
9 No'lu Ortam	15	15	15		13	10	14		86.6	66.6	93.3	82.1	12	10	14	79.9
									F=3.673; LSD=24.828; HKO=209.219; p<0.05							
									F=6.120; HKO=197.803; LSD=33.057; p<0.01							



Şekil 4.19. Köklendirme ortamında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün sayısı (adet), ortalama köklenen sürgün sayısı (adet).



Şekil 4.20. Köklendirme ortamında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün yüzdesi (%), ortalama köklenen sürgün yüzdesi (%).

Canlı sürgün yüzdesi bakımından en yüksek sonuçlar 7 no'lu ortamda %86.6; 8 no'lu ortamda %84.4 ve 9 no'lu ortamda %82.1 olarak gözlenmiştir. Köklenen sürgün yüzdesi bakımından ise en yüksek sonuçlar 7 no'lu ortamda %86.6; 8 no'lu ortamda %84.4 ve 9 no'lu ortamda %79.9 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11); (Şekil 4.19); (Şekil 4.20).

Ahmad et. al. tarafından 2004' te yapılan bir çalışmada GF-677 meyve anacının *in vitro* köklenmesi için 3 oksin (IAA, IBA, NAA) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/l konsantrasyonlarında denenmiştir. NAA ve IAA kök büyümesini olumsuz etkilerken, bu anacın *in vitro* köklenmesi için IBA tercih edilebilir bir oksin olarak belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da köklendirme ortamına ilave edilen 1.00 mg/L IBA'nın mikro sürgünlerindeki kök sayısı üzerine etkisi istatistiksel açıdan diğer konsantrasyonların etkisiyle karşılaştırıldığında 0.05 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır (Özden, 2007). Çalışmamızda da, köklenen sürgün yüzdesi bakımında en iyi sonuçlar 0.5 mg/L IBA (7 no'lu ortam) ve 1 mg/L IBA (8 no'lu ortam) kullanılan ortamlardan elde edilmiştir. Bitkicik boyu (cm) ve ortalama bitkicik başına düşen kök sayısı bakımından en yüksek sonuçlar, 1 mg/L IBA kullanılan 8 no'lu ortamdan sağlanmıştır. Aktif karbonun kullanıldığı 4,5 ve 6 no'lu ortamlarda bitki boylarının daha kısa, köklerin de daha kısa ve az sayıda olduğu belirlenmiştir. Phloroglucinol maddesinin kullanıldığı 7, 8 ve 9 no'lu ortamlarda ise bitkicik boylarının daha uzun ve kök sayısının ise daha fazla olduğu gözlenirken, phloroglucinol'un aktif karbon gibi baskılayıcı özelliği görülmemiştir.

Antonopoulou ve ark. (Antonopoulou et al., 2007) yaptıkları bir araştırmada, GF-677 meyve anacının *in vitro* köklenmesinde Fe-EDDHA'nın (%6 Fe) demir tuzlarının şelat formunun etkisini çalışmışlardır ve 280 mg/L Fe-EDDHA içeren ortamda büyüyen eksplantlar en iyi köklenme sonucunu vermiştir. Molassiotis ve ark. (Molassiotis et al., 2003) ise GF-677 meyve anacının *in vitro* köklenmesinde organik (Fe-EDTA ve Fe-EDDHA) ve inorganik (FeCl₃) demir maddelerinin etkilerini çalışmışlardır. Demir yokluğunda veya FeCl₃ varlığında daha az köklenme görülmüşken, tamamen köklenme (%100) Fe-EDDHA ile beslenen eksplantlarda gözlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, köklenmede Fe-EDDHA ve Fe-EDTA'nın 100, 200 ve 300 mg/L konsantrasyonların etkileri değerlendirilmiştir. 200 mg/L Fe-EDDHA, %95 köklenme yüzdesi sağlamış, 3.40 adet kök sayısı ve 6.88 cm kök uzunluğu üretmiştir (Ul Hasan et al., 2010). Çalışmamızda ise IBA'nın 0.5

mg/L ve 1 mg/L konsantrasyonlarında köklenme yüzdeleri sırası ile 86.6 ve 84.4 gözlenirken; bitkicik başına düşen ortalama kök sayısı IBA'nın 1 mg/L konsantrasyonunda 10.3 adet olarak belirlenmiştir.

Garoosi ve ark. (Garoosi et al., 2010) tarafından yapılan çalışmada GF-677 hibrit meyve anacının, GNH (Garoosi, Nezami ve Haddad) ortamında *in vitro* sürgün çoğaltımında bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, GF-677 meyve anacının mikroçoğaltımı için uygulanabilir bir protokol sağlama kapsamında, GNH ortamında bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin çoğaltımında ve kök indüklenmesinde etkilerine yoğunlaşmıştır. Çalışma sonunda ise en yüksek köklenme oranı (%40'a kadar), 2 mg/l IBA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

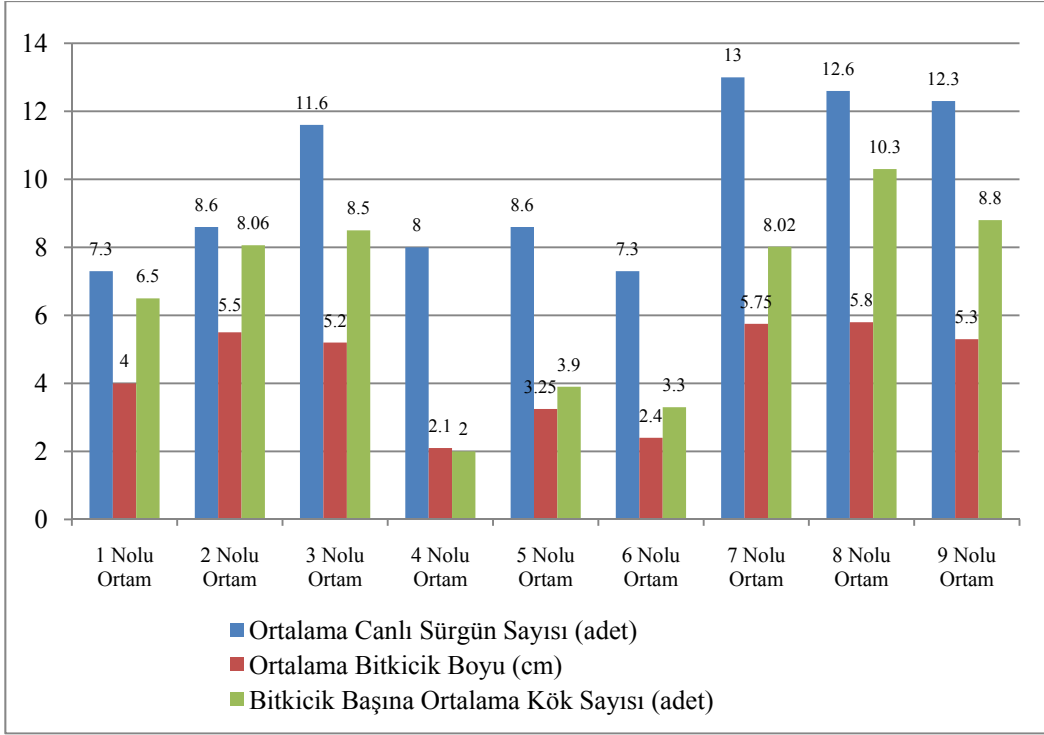
Dokuz farklı MS besin ortamında ortalama bitkicik boylarına bakıldığında, en uzun bitkicik boyu 8 no'lu ortamda ortalama 5.8 cm olarak gözlenmiştir ve bunu 5.75 cm ile 7 no'lu ortam izlemiştir (Çizelge 4.12). Canlı sürgünlerde ortalama kök sayısına bakıldığında, en yüksek değer ortalama 10.3 adet kök sayısı ile 8 no'lu ortamdan elde edilmiştir. Bunu 8.8 (adet) kök sayısı değeri ile 9 no'lu ortam izlemiştir (Çizelge 4.12); (Şekil 4.21).

Dokuz farklı köklendirme ortamına alınan sürgünlerin canlı kalma yüzdeleri istatistiksel olarak %5 önem düzeyinde etkili bulunmuştur ($F=3.673$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 7 (86.63) ve 8 (84.43) no'lu ortamlar birinci grupta; 9 (82.16) no'lu ortam ikinci grupta; 3 (77.73) no'lu ortam üçüncü grupta; 2 (57.73) ve 5 (57.73) no'lu ortam dördüncü grupta; 4 (53.30) no'lu ortam beşinci grupta; 1 (48.86) ve 6 (48.83) no'lu ortamlar altıncı grupta yer almışlardır ($HKO=209.219$; $LSD=24.828$); (Çizelge 4.11).

Köklenen sürgün yüzdesi için yapılan istatistiksel analizde besin ortamlarının %1 önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir ($F=6.120$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 7 (86.63) ve 8 (84.43) no'lu ortamlar birinci grupta; 9 (79.96) ve 3 (77.73) no'lu ortamlar ikinci grupta; 2 (55.53) no'lu ortam üçüncü grupta; 5 (51.10) ve 1 (48.86) no'lu ortam dördüncü grupta; 6 (42.16) ve 4 (33.33) no'lu ortamlar beşinci grupta yer almışlardır ($HKO=197.803$; $LSD=33.057$); (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12. Köklendirme ortamlarında kültüre alınan *in vitro* sürgünlerde gözlenen canlı sürgün sayısı (adet), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet).

Sürgünler																			
Besin Ortamları				Kültüre Alınan Sürgün Sayısı (adet)				Canlı Sürgün Sayısı (adet)				Ortalama Bitkicik Boyu (cm)				Bitkicik Başına Ortalama Kök Sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1 No'lu Ortam	15	15	15	5	9	8	7.3	D	4	4.5	3.5	4	BC	8.2	5.7	5.6	6.5	BC	
2 No'lu Ortam	15	15	15	11	7	8	8.6	BCD	5	6	5.5	5.5	AB	8.8	7.1	8.3	8.06	AB	
3 No'lu Ortam	15	15	15	10	14	11	11.6	ABC	4.1	6	5.6	5.2	AB	6.1	10.5	9	8.5	AB	
4 No'lu Ortam	15	15	15	7	8	9	8	CD	3.25	1.25	2	2.1	C	2.2	1.3	2.5	2	D	
5 No'lu Ortam	15	15	15	5	10	11	8.6	BCD	3.75	2	4	3.25	C	4.4	3.4	4.09	3.9	CD	
6 No'lu Ortam	15	15	15	4	10	8	7.3	D	2	3.25	2	2.4	C	3.2	3.2	3.6	3.3	D	
7 No'lu Ortam	15	15	15	11	14	14	13	A	5.25	6	6	5.75	AB	6.5	8.07	9.5	8.02	AB	
8 No'lu Ortam	15	15	15	12	12	14	12.6	A	5.6	5.5	6.5	5.8	A	10.08	11.2	9.9	10.3	A	
9 No'lu Ortam	15	15	15	13	10	14	12.3	AB	4.6	5	6.3	5.3	AB	8.6	7.2	10.7	8.8	AB	
				F=3.675; HKO=4.704 ;LSD=3.723 p<0.05					F=10.46 HKO=0.613;LSD=1.840 p<0.01					F=15.38; HKO=1.610;LSD=2.983; p<0.01					



Şekil 4.21. Köklendirme ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde ortalama canlı sürgün sayısı (adet), ortalama bitkicik boyu (cm), bitkicik başına ortalama kök sayısı (adet).

Dokuz farklı köklendirme ortamına alınan sürgünlerin canlı kalma sayıları istatistiksel olarak %5 önem düzeyinde etkili bulunmuştur ($F=3.675$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 7 (13.00) ve 8 (12.667) no'lu ortamlar birinci grupta; 9 no'lu ortam 2. grupta (12.33); 3 no'lu ortam (11.667) 3. grupta; 2 (8.667) ve 5 (8.667) no'lu ortamlar 4. grupta; 4 (8.00) no'lu ortam 5. grupta; 1 (7.33) ve 6 (7.33) no'lu ortamlar ise 6. grupta yer almışlardır ($HKO=4.704$; $LSD=3.723$); (Çizelge 4.12).

Ortalama bitki boyu için yapılan istatistiksel analizde besin ortamlarının %1 önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir ($F=10.46$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 8 (5.86) no'lu ortam birinci grupta; 7 (5.75), 2 (5.50), 9 (5.30), 3 (5.23) no'lu ortamlar ikinci grupta; 1 (4.00) no'lu ortam üçüncü grupta; 5 (3.25), 6 (2.41), 4 (2.16), no'lu ortamlar dördüncü grupta yer almışlardır ($HKO=0.613$; $LSD=1.840$); (Çizelge 4.12).

Canlı sürgünlerde ortalama kök sayısı için yapılan istatistiksel analizde besin ortamlarının %1 önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir ($F=15.38$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde 8 (10.39) no'lu ortam

birinci grupta; 9 (8.83), 3 (8.53), 2 (8.06), 7 (8.02), no'lu ortamlar ikinci grupta; 1 (6.50) no'lu ortam üçüncü grupta; 5 (3.96) no'lu ortam dördüncü grupta; 6 (3.33) ve 4 (2.00) no'lu ortamlar beşinci grupta yer almışlardır (HKO=1.61; LSD=2.98); (Çizelge 4.12).



(a)



(b)

Şekil 4.22. (a) 7 no'lu ortamda gelişme gösteren bitkicikler (b) 8 no'lu ortamda gelişme gösteren bitkicikler



(a)



(b)

Şekil 4.23. (a) 7 no'lu ortamda köklenen bitkiler (b) 8 no'lu ortamda köklenen bitkiler

4.4 Aklimatizasyon ve dış koşullara aktarma

Köklendirme denemelerinden sonra, elde edilen bitkiciklerin dış ortama adaptasyonları için ön alıştırma işlemi bitkicikler henüz kültür kabı içerisindeyken bitki büyüme odasında yapılmıştır. Bunun için kademeli olarak; 1. gün kültür kaplarının kapakları açılarak hafif bir şekilde aralanmış, 2. gün kapakların aralığı biraz daha arttırılmış ve 3. gün kapaklar tamamen açılarak ve bu şekilde kültür kabı içerisindeki nem oranı dereceli olarak düşürülmüştür. Bitkicikler agarlı ortamlardan köklerine zarar vermeden çıkarılmış, ve üzerindeki agarlı besin ortamı kalıntıları su ile temizlenerek aklimatizasyon için hazırlanmışlardır. Sonraki aşamalarda oluşabilecek hastalıklara karşı korunmaları amacı ile dış koşullara aktarılmadan önce bitkiciklerin kökleri 1 ppm konsantrasyonunda hazırlanmış bakırlı su çözeltisine (Talicopper-Bakır Sülfat içerikli) batırılmıştır. Bu ön uygulamadan sonra bitkicikler kısa, orta, uzun şeklinde bitki boylarına göre sınıflandırılarak, torf:perlit:kum (1:1:1) karışımı içeren viollere aktarılmışlardır. 290 adet bitkiden 170 adeti (%58.62) başarılı bir şekilde aklimatize edilmiştir. Özden, 2007'nin yaptığı çalışmada 1 mg IBA içeren ½ MS besin ortamında %84.2 köklenme elde edilirken, köklü bitkiciklerin %66.4'ü dış koşullara alıştırılabilmektedir. Ahmad et al., 2004 'ün yaptığı çalışmada ise iyi köklenmiş bitkicikler seraya başarılı bir şekilde aktarılmıştır ve %80 hayatta kalabilme ile büyümüşlerdir.



Şekil 4.24. Bitkilerin, büyüme odalarında aklimatize durumunda genel görünümü.

5. SONUÇ

Çalışmada, GF-677 hibrit meyve anacına ait sürgün ucu, koltukaltı tomurcuk ve nod eksplantları 5 farklı MS besin ortamında başarılı olarak kültüre alınmışlardır ve herhangi bir kontaminasyon sorunu yaşanmamıştır.

Alt kültürlemeler sonunda, eksplant tipleri arasında karşılaştırma yapıldığında en iyi gelişmenin nod eksplantlarında olduğu gözlenmiştir. 3. Alt kültürde, 1 ve 2 no'lu ortamlarda nod eksplantlarında en düşük vitrifikasyonlu eksplant yüzdeleri sırası ile %5.2, %7.4 ve en yüksek çoğalma katsayıları ise 4.9, 5.5 olarak belirlenmiştir. Aktif karbon kullanılan 1 no'lu ortamda vitrifikasyonun azaldığı ve bununla birlikte çoğalma oranının da düştüğü görülmüştür. Ayrıca çalışmada sürgün boylarının daha kısa ve yaprakların daha koyu yeşil oldukları belirlenmiştir. Phloroglucinol'un kullanıldığı 2 no'lu besin ortamında eksplantların çoklu sürgün oluşturma oranlarının teşvik edildiği saptanmış, sürgün boylarının da daha uzun ve yaprak renginin daha açık yeşil olduğu gözlenmiştir.

GF-677 hibrit anacında *in vitro* kök oluşumu için IBA'nın farklı konsantrasyonları (0.5, 1 ve 2 mg/L) ile aktif karbon ve phloroglucinol denenmiştir. Canlı sürgün yüzdesi ve köklenen sürgün yüzdesi bakımından en iyi sonuçlar 7 (0.5 mg/L IBA) ve 8 (1 mg/L IBA) no'lu ortamlardan elde edilmiştir. 7 ve 8 no'lu besin ortamlarında canlı sürgün yüzdeleri sırası ile %86,6 ve %84,4; köklenen sürgün yüzdeleri de sırasıyla %86,6 ve %84,4 olarak belirlenmiştir. Bitkicik boyu (cm) ve ortalama bitkicik başına düşen kök sayısı (adet) bakımından en yüksek değerler 8 no'lu ortamdan (1 mg/L IBA) sağlanmıştır. 8 no'lu besin ortamında ortalama bitkicik boyu 5.8 cm; bitkicik başına düşen ortalama kök sayısı 10.3 adet olarak belirlenmiştir. Bitkiciklerin kök renklerinde değişiklik gözlenmemekle birlikte, phloroglucinol içeren ortamlarda, ortam renginden dolayı bitkicik kökleri de hafif sarımsı turuncu renkte gözlenmiştir. Bitkicik köklerinde tüy oluşumu gözlenmemiştir. İlk kök çıkışı 15. günde görülmüştür.

Çalışmada, bitkiler dış koşullara aktarıldıklarında %58.62 oranında bir başarı ile aklimatize edilmişlerdir.

Araştırmamızda; hem sürgün oluşumu ve çoğalması, hem de köklenme açısından önemli bulgular elde edilmiştir. GF-677'nin mikroçoğaltımı için yapılacak araştırmalarda tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular önemli bir

kaynak olarak kullanılabilecek niteliktedir. GF-677 meyve anacı mikroçoğaltım prosedürünü hızlandırmak için, bundan sonra yapılacak çalışmalarda nod eksplant tipi seçimi büyük önem taşımaktadır. Büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonları, aktif karbon ve phloroglucinol'un değişik içerikleri ile yeni denemeler kurularak, vitrifikasyon probleminin azaltılması ve çoğalma katsayılarının artırılması sağlanmalıdır. Ayrıca bundan sonra yapılacak araştırmalarda farklı kültür koşulları da denenerek, başarılı sonuçların alınmasına çaba sarfedilmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A.,** 2004, Biyolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri, Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayın No:2, İzmir, 215-225s.
- Ahmad, T., Rahman, H.U., Ahmed, CH.M.S. and Laghari, M.H.,** 2003, Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677, *Pak. J. Bot.*, 35(3):331-338.
- Ahmad, T., Rahman, H.U. and Laghari, M.H.,** 2004, Effect of different auxins on *in vitro* rooting of peach rootstock GF 677, *Sarhad J. Agric.*, 20(3):373-375.
- Ahmad, T., Abbasi, N.A., Hafız, I.A. and Ali, A.,** 2007, Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677, *Pak. J. Bot.*, 39(4):1269-1275.
- Anderson, W.C.,** 1984, A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109:343-347.
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I. and Chatzissavvidis C.,** 2004, The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock, *Biologia Plantarum*, 48(4):549-553.
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis C. and Tsirakoglou V.,** 2005, Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B₂) on the *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*), *Scientia Horticulturae*, 106(2005):268-272.
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis C. and Papadakis, I.,** 2007, The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF- 677 explants, *Acta Physiol Plant*, 29:559-561.
- Arıcı, Ş.E.,** 2008, Bazı sert çekirdekli meyve anaçlarının doku kültürü ile çoğaltılması, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1):19-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bussi, C., Besset J. and Girard T.,** 2002, Effects of peach or hybrid rootstocks on growth and cropping of two cultivars of peach trees (Emeraude and Zephyr), *Fruits*, 57(4):249-255.
- Çelik, T.,** 2008, Klonal Anaç Genotiplerinin *In Vitro* Koşullarda Bazı Prunus Türleriyle Aşı Tutma Oranlarının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 36s.
- Damiano, C. and Monticelli S.,** 1998, *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(2):1-7.
- Demirkök, Ş.G.,** 2006, GF-677, AK-1 ve AK-2 Badem x Şeftali Melez Anaçlarının Sürgün Ucu Yöntemiyle *in vitro* Klonal Mikroçoğaltımı, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 41s.
- Fitotechniki Tissue Culture Laboratory,** ‘‘Micropropagated Rootstocks For Fruit Trees’’, <http://www.fitotechniki.com/Full%20Products.pdf> (Erişim Tarihi: 3 Nisan 2012).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations,** 2010a, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim Tarihi: 21 Haziran 2012).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations,** 2010b, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim tarihi: 21 Haziran 2012).
- Garroosi, G.A., Alanagh, E.N. and Haddad, R.,** 2010, The effect of PGRs on *in vitro* shoot multiplication of GF 677 hybrid (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium, *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1(1): 34-43.
- Gür, İ.** 2011, ‘‘Şeftali Yetiştiriciliği’’, http://www.marim.gov.tr/bilgi_kaynagi/%C5%9Eeftali%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf (Erişim tarihi: 1 Nisan 2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kamali, K., Majidi E. and Zarghami R.,** 2001, Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus* × *P. persica*), Iranian Research Organization Science and Technology, 56:175-177.
- Kestane Araştırma Grubu,** 2010,
<http://www.kestanearamastirmagrubu.com/arastirmalar/cogaltma/sertkabuk.html> (Erişim Tarihi: 28 Temmuz 2010).
- Křižan, B., Ondrušiková, E., Dradi G. and Rocasaglia R.,** 2006, The effect of paclobutrazol on *in vitro* rooting and growth of GF-677 hybrid peach rootstock, *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(1):21-26.
- Marino, G. and Ventura M.,** 1997, The influence of ethylene on *in vitro* rooting of GF 677 (*Prunus persica* × *Prunus Amygdalus*) hybrid peach rootstock, *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 33:26-29.
- Molassiotis, A.N., Dimassi, K., Therios, I. and Diamantidis, G.,** 2003, Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) explants *in vitro*, *Biologia Plantarum*, 47(1):141-144.
- Murashige, T. and Skoog F.,** 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- Najafian, S., Rahemi, M. and Tavallali, V.,** 2008, Growth and chemical composition of hybrid GF 677 (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*) influenced by salinity levels of irrigation water, *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(3):309-313.
- Özbek, B.,** 2011, Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının *In Vitro* Çoğaltımı Ve Kök-Ur Nematodlarına Karşı Dayanıklılıklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 63s.
- Özden, A.N.,** 2007, GF-677 Hibrit (*Prunus Amygdalus* × *P. persica*) Anacının *In Vitro* Rejenerasyonu ve Mikro Çoğaltımı, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 50s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özsu, B.**, 2003, ‘‘Badem Sektörü’’, <http://www.ito.org.tr/itoyayin/0009998.pdf> (Erişim tarihi: 3 Nisan 2012).
- Sepahvand, S., Ebadi A., Kamali, K. and Ghaemmaghami, S.A.**, 2012, Effects of myo-inositol and thiamine on micropropagation of GF 677 (Peach × Almond Hybrid), *Journal of Agricultural Science*, 4(2):275-280.
- Sotiropoulos, T.E., Dimassi, K.N., Tsirakoglou, V. and Therios, I.N.**, 2006, Responses of two *Prunus* rootstocks to KCl induced salinity *in vitro*, *Biologia Plantarum*, 50(3): 477-480.
- Şenyay, D.**, 2008, Sakız Ağacının (*Pistacia lentiscus L.*) *in vitro* Koşullarda Rejenarasyonu Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 69s.
- Tsipouridis, C. and Thomidis, T.**, 2003, Methods to improve the *in vitro* culture of GF 677 (peach × almond) peach rootstock, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4): 361-364.
- Ul Hasan, S.Z., Ahmad, T., Hafız, I.A. and Hussain A.**, 2010, Direct plant regeneration from leaves of prunus rootstock GF-677 (*Prunus Amygdalus* × *P. Persica*), *Pak. J. Bot.*, 42(6): 3817-3830.
- Younas, M., Rahman, H.U., Siddiqui, S.U. and Chaudhary, M.F.**, 2008, Effect of different carbon sources on *in vitro* shoot proliferation and rooting of peach rootstock GF 677, *Pak. J. Bot.*, 40(3): 1129-1134.

ÖZGEÇMİŞ

12.04.1986 Adana doğumlu Bahar Kabakçı orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 2005 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2009 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyolog ünvanını aldı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı.

