

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE SOMATİK
EMBRYOGENEZ VE ORGANOGENEZ YÖNTEMLERİ İLE ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: BURHAN AVAŞ

DANIŞMAN: DOÇ. DR. MUSA TÜRKER

VAN-2013

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HIYAR (*Cucumis sativus* L.) BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE SOMATİK
EMBRYOGENEZ VE ORGANOGENEZ YÖNTEMLERİ İLE ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: BURHAN AVAŞ

VAN-2013

KABUL ve ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Musa TÜRKER danışmanlığında, Burhan AVAŞ tarafından sunulan “Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Bitkisinin Doku Kültüründe Somatik Embriyogenez ve Organogenez Yöntemleri ile üretimi” isimli bu alışma Lisansüstü Eğitim ve ėretim Yönetmeliėi'nin ilgili hükümleri gereğince 18/04/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Başkan: Doç. Dr. Musa TÜRKER

ye: Doç. Dr. Yusuf UZUN

ye: Yrd. Doç. Dr. Nurhan KESKİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2013 tarih ve/..... Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

HIYAR (*Cucumis sativus* L.) BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE SOMATİK EMBRİYOGENEZ VE ORGANOGENEZ YÖNTEMLERİ İLE ÜRETİMİ

AVAŞ, Burhan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Musa TÜRKER

Mayıs 2013, 50 sayfa

Tohumlar laboratuvarında 1 litrelik kavanozlarda steril hazır ortamlarda çimlendirilerek, kotiledon, hipokotil, yaprak, yaprak sapı, eksplant olarak alınarak Büyümeyi Düzenleyici Maddelerle desteklenmiş MS, SH ve B5 ortamlarına ekilmiştir. NAA ve 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil eksplantından embriyogenik kallus elde edilmiştir. BAP, IAA ve NAA ile desteklenmiş ortamlarda yaprak, hipokotil ve kotiledon öncelikle organogenik kallus elde edilmiştir. Organogenik kalluslardan adventif kök primordiyumları, daha sonra sürgün ve kök gelişimi sağlanmıştır. Somatik embriyogenez çalışmaları için en iyi sonuçlar, 1-2 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil eksplantından elde edilmiştir. Organogenez için ise en iyi sonuçlar 0,5 mg/l BAP ve IAA ile desteklenmiş MS ortamında kotiledon eksplantından elde edilmiştir. Embriyogenik kalluslar sıvı ortamlara transfer edilerek proembriyo, globular, kalp, torpedo şekillerindeki embriyo öncülleri ve daha sonra olgun embriyolar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Somatik embriyogenez, organogenez, hıyar

ABSTRACT

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND ORGANOGENESIS STUDIES ON CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) PLANT

AVAŞ, Burhan

Msc Thesis, Biological Science

Supervisor; Assoc. Prof. Musa TÜRKER

May 2013, 50 Pages

Seeds of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) plant were surface sterilised and incubated in sterile ready made media. Seedlings were grown in 1 l jars. Hypocotyl, cotyledone, leaf and petiol, nod, shoot tip explants were excised from seedlings and incubated in MS, SH, B5 media supplemented with Plant Growth Regulators (PGRs). Embryogenic callus was produced from hypocotyl explant in MS medium supplemented with NAA and 2,4-D. At the beginning BAP produced callus. Later organogenic root and shoot were grown from callus. Later Adventitious root primordium was appeared from callus and adventitious shoot and root were grown from explant. The best conditions for somatic embriyogenesis is; MS medium supplemented with 1-2 mg/l NAA with hypocotyl explant. For organogenesis, MS medium supplemented with 0,5 mg/l BAP and IAA from cotyledone. Embryogenic calli were transferred to liquid medium and proembriyo, globular, heart, torpedo and mature embriyo were provided from liquid medium.

Keywords: Somatic embryogenesis, organogenesis, cucumber.

ÖN SÖZ

Artan nüfusa karşın azalan ekim alanları bilim insanlarını çevre şartlarına bağılı kalmadan laboratuvar ortamında az bir mekanda, düşük maliyette ve bol miktarda ürün elde etmeye yöneltmiştir. Ayrıca doğal ortamda çoğalma zorluğuna maruz kalan veya nesli tükenmek üzere olan ekonomik değeri yüksek bitkiler doku kültürü ile çoğaltılmaktadır.

Hücresele düzeyde genetiğı değıştirilmiş veya moleküler olarak ıslah edilmiş türlerin rejenerasyonu yine doku kültürüne ihtiyaç duyar. Bitki doku kültüründe doğrudan klonal üretim, organogenez, somatik embriyogenez gibi yöntemler kullanılarak bitkiler rejenere edilir.

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve eksplantlar iklim dolabında inkübe edilmiştir. Teknolojik ve ekonomik önemi oldukça popüler olan bu çalışmalarda daha iyi sonuçlar elde edebilmek için modern iklim dolaplarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, maddi ve manevi olarak yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, Doç. Dr. Musa TÜRKER'e ve bitkinin teşhisinde yardımcı olan Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi ÖZGÖKÇE hocama teşekkürlerimi sunarım.

Hıyar, tohumlarının temin edilmesinde yardımcı olan, geçitboyu köyünden Burhan ZEYREK'e, çalışmalarımı beraber yürüttüğüm tez arkadaşım Ali İhsan Nazif AGİTOĞLU'na, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Ömer BİNGÖL'e ve bana her türlü manevi destek veren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu	2
1.1.1. Organogenez	2
1.1.2. Somatik embriyogenez	3
1.1.3. Bitki doku kültürlerinin uygulama alanları	4
1.1.4. Bitki doku kültürü ile yapılmış çalışmalar	5
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Teşhisi	12
3.2. Sterilizasyon	12
3.2.1. Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu	12
3.2.2. Besin ortamının sterilizasyonu	13
3.2.3. Tohumların sterilizasyonu	13
3.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları	13
3.4. Büyümeyi Düzenleyici Maddeler (BDM)	13
3.5. Beyaz Hıyarların <i>In Vitro</i> 'da Çimlendirilmesi	14
3.6. Genel Doku Kültürü Şartları ve Besin Ortamlarının Hazırlanması	14
3.7. <i>In Vitro</i> 'dan Elde Edilen Beyaz Hıyar Fidelerinden Bitki	
Eksplantların İzolasyonu	14
3.8. BDM'lerin Konsantrasyon ve kombinasyonlarının Belirlenmesi	16
4. BULGULAR	17
4.1. Sürgün Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve	
Eksplantların Etkisi	17

4.2. Kök Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi	18
4.3. Kallus Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi	19
4.4. Organogenik Kallus Oluşumu	23
4.5. Adventif Kök Gelişimi	32
4.6. Somatik Embriyo Oluşumu	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR	44
ÖZ GEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Tabii ortamda yetiştirilen Beyaz Hıyar.	12
Şekil 4.1. Sterilize edilen tohumlardan, hormonsuz MS ortamında yetiştirilen fideler.	17
Şekil 4.2. Eksplantların besi ortamlarına dikimi.	21
Şekil 4.3. a. 1mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında kallus ve sürgün oluşumu.	23
Şekil 4.3. b. 1mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında kallus ve sürgün oluşumu.	24
Şekil 4.4. a. 1mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu.	24
Şekil 4.4. b. ve c. 1mg1mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu.	25
Şekil 4.5. NAA'nın farklı konsantrasyonlarında hipokotilde kallus oluşumu.	26
Şekil 4.6. a. 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök ve yaprak gelişimi.	27
Şekil 4.6. b. 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök gelişimi.	27
Şekil 4.7. 1mg/l IAA içeren MS ortamında yaprak sapında kök gelişimi.	28
Şekil 4.8. 1mg/l IAA içeren MS ortamında yaprakta kök gelişimi.	28
Şekil 4.9. 1mg/l IAA içeren MS ortamında kotiledonda kök gelişimi.	29
Şekil 4.10. 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök gelişimi.	29
Şekil 4.11. a. 1mg/l ABA içeren MS ortamındaki hipokotilde kök ve yaprak gelişimi.	30
Şekil 4.11. b. 1mg/l ABA içeren MS ortamında hipokotil eksplantında kök gelişimi.	30
Şekil 4.12. a. ve b. BDM'siz MS ortamında hipokotil eksplantından kök ve sürgün oluşumu.	31
Şekil 4.13. Organogenez oluşumu.	32
Şekil 4.14. a. ve b. Yaprakta kök promordiyumu.	33
Şekil 4.15. a. ve b. Proembriyo şeklindeki hücre topluluğu.	34
Şekil 4.16. a. ve b. Globular şeklindeki embriyonik yapı.	35
Şekil 4.16. c. Globular şeklindeki embriyonik kümeler.	36
Şekil 4.17. a. Kalp şeklindeki embriyonik yapı.	36
Şekil 4.17. b. Kalp şeklindeki embriyonik yapı.	37
Şekil 4.18. a. Torpido şeklindeki embriyonik yapı.	37
Şekil 4.18. b. Torpido şeklindeki embriyonik yapı.	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hazır temel besin ortamları ve içerikleri	15
Çizelge 3.2. BDM'lerin konsantrasyon ve kombinasyonları	16
Çizelge 4.1. Sürgün Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi	18
Çizelge 4.2. Kök Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi	19
Çizelge 4.3. Kök Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi	20
Çizelge 4.4. Farklı BDM'ler ile desteklenmiş MS ortamında hıyar bitkisinin farklı eksplantlarının kallus geliştirme kapasiteleri	22
Çizelge 4.5. MS ortamında farklı BDM kullanılarak eksplantların kallus oluşturma potansiyelleri	22

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	Dakika
g	Gram
gr/l	Gram/litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/ml	Miligram/mililitre
mg/l	Miligram/litre
ml	Mililitre
μM	Mikromolar

Kısaltmalar

2,4-D	2,4-Dikloro fenoksi asetik asit
BA	Benzil adenin
BAP	Benzil amino pürin
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
GA ₃	Giberellik asit
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit
IPA	İzopentenil adenin
KN	Kinetin
MS	Murashige ve skoog
NAA	Naftalen asetik asit
PAA	Fenoksi asetik asit
TDZ	Thidiazuran
Ze	Zeatin

1. GİRİŞ

Dünya nüfusu beslenmesinde en çok kullanılan yaklaşık 30 bitki grubu içinde en önemlileri tahıllar, endüstri bitkileri, sebzeler, meyveler ve baklagillerdir. Bununla beraber dünya florasında 3000 türün besin değerine sahip olduğu bildirilmektedir (Babaoğlu, 1998).

Cucurbitacea (kabakgiller) familyası 118-122 cins ve yaklaşık 900 tür içerir ve sebzeler içinde önemli bir yere sahiptir (Simpson, 2012).

Hıyarın sistematikteki yeri şöyledir.

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom: *Tracheobiphyta*

Divisio: *Magnoliophyta*

Classis : *Magnoliopsida*

Subclassis: *Dilleniidae*

Ordu : *Cucurbitales*

Familya : *Cucurbitaceae*

Genus : *Cucumis*

Species : *Cucumis sativus* L.

Düşük kalorisi (100 g' da 12 kalori), lezzeti, aroması ve hoş kokusuyla herkesin özellikle diyet yapanların gözdesidir. Taze olarak tüketildiği gibi, turşu yapılarak besin sanayinde, değişik şekillerde işlenerek kozmetik sanayinde kullanılan hıyarın dişi çiçekleri Japonya'da süsleme amaçlı kullanılır. Güneydoğu Asya'da yaprağı salata olarak ve pişirilerek tüketilir (Anonim, 2007).

Türkiye'de 35 yıl önce başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları, başlangıçta doku kültürleri üzerinde yoğunlaşmış, son 10 yılda da moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri ile bütünleşmeye başlamıştır. Bu araştırmalarda virüssüz meyve ve asma fidanı üretimi, dihaploid hatların üretimi ile ıslah süresinin kısaltılması ve hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, kısa sürede çok verim elde etme gibi konularda pratik sonuçlar elde edilmiştir (Babaoğlu ve ark., 2001). Doku ve organ kültürleri aynı zamanda genetik manipülasyonlara da imkân sağlayan ortamlardır. Kültür ortamlarında bitki üretimi, yani mikroçoğaltım yöntemlerinden en yaygın olanları;

- Adventif sürgün rejenerasyonu
- Organogenez
- Somatik Embriyogenez'dir.

1.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Bitkilerden izole edilmiş bir sürgün, kök, yaprak, çiçek, hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir bitki rejenere edilebilir (Gönülşen, 1987). *In vitro*'da hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarabilmek için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel çevre koşullarının uygun olması gerekmektedir (Murashige, 1974; Evans ve Reed, 1981; Ammirato, 1983).

Doku kültüründe en çok kullanılan temel ortam, Murashige ve Skoog (1962)' un geliştirdiği besin ortamıdır.

Besin ortamına eklenen büyümeyi düzenleyici maddelerde bitki rejenerasyonuna etki eden önemli faktörlerdendir. Genellikle yüksek oranda İndol -3- asetik asit (IAA), İndol -3- bütirik asit (IBA), Naftalen asetik asit (NAA), 2,4-Dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D) gibi oksin grubu hormonların kallus gelişimini, sitokininlerin ise adventif sürgün rejenerasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Miller ve Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968).

Kallus düzensiz bölünen, organize olmamış hücreler kümesidir (Gamborg ve Shyluk, 1981).

Bitki hücre ve kallus dokularından *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu, organogenez ve somatik embriyogenez olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

1.1.1. Organogenez

Normal bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma geçirerek kök, gövde, yaprak gibi bitkinin farklı organlarını oluşturur. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler bitkinin normal hayat döngüsü boyunca devam eder.

Doku kültürü ortamında ise hücrelerin bölünmeleri sonucunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenez) ya da hücreler yığını olan kallus oluşur. Bu kallustan ise sürgün veya kök meydana gelir (indirekt organogenez) (Gürel, 1997). İndirekt organogenezde eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyarılır. Daha sonra bu kallus üzerinde meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök oluşumu gözlenir. Direkt organogenezde ise hiç kallus gelişimi olmadan sürgün oluşumu gözlenir. Organogenez hücre ve dokulardan yeni bir bitki oluşmasını sağladığı için generatif yollardan çoğaltılması zor bitki türlerinin çoğaltılmasını sağlar.

1.1.2. Somatik embriyogenez

Somatik hücrelerden elde edilen embriyolara somatik embriyo, adventif embriyo veya vejetatif embriyo adı verilir. Somatik embriyoların gelişimi de zigotik embriyoların gelişimine benzer. Somatik embriyogenez için değişik bitki kısımları kullanılır. Özellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar başta olmak üzere çiçek kısımları, anter, polen ve endospor dokularının somatik embriyogenez için bir başlangıç olduğu bildirilmiştir (Sharp ve ark., 1983; Pierik, 1987; Er ve Canpolat, 1992).

Somatik embriyogenez de direkt ve indirekt olmak üzere iki tipte oluşur. (Sharp ve ark., 1983). Direkt somatik embriyogenezde somatik embriyolar hücre ya da dokudan ara bir kallus oluşturmada gelişirler. Bu tip embriyogenez genellikle bitkilerin gövde ve epidermal hücreleri eksplant olarak kullanıldığında görülür (Pierik, 1987). İndirekt somatik embriyogenez ise kültüre alınan protoplast ya da eksplantlardan önce kallus oluşumu gözlenir, ardından kalluslar üzerinde embriyoidler oluşur. Embriyo ve embriyoidler tek hücreden gelişebildiği gibi hücre gruplarından da gelişebilir (Evans ve ark., 1981). Somatik embriyogenezin teşviki için öncelikle hücre veya eksplantlar yüksek oksin içeren (genellikle 2,4-D) besin ortamında kültüre alınırlar. Daha sonra da oksin içermeyen ortama aktarılırlar.

1.1.3. Bitki doku kültürlerinin uygulama alanları

Modern tarımda en fazla 150 bitki türünün tarımının yapıldığı ve bunların iyileştirilmesinde klasik yöntemlerin sınırına gelindiği düşünülürse, bitki doku kültürü tekniklerinin süratle geliştirilmesi ve uygulanmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Bitki doku kültürünün en önemli etkisi ve uygulama alanı mikroçoğaltım ve bitkilerin hücre bazında kontrollü olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemle; soğuğa, kurağa, tuza, ağır metallere, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkiler yetiştirilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001).

Ayrıca besin olarak kullanılan bitkilerin raf ömrünün uzatılması, depolamaya dayanıklı olma, kesme çiçeklerde vazo ömrünün uzatılması, patojensiz bitki elde etmede meristematik hücrelerin kullanımı gibi konularda doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Bu hücreler kullanılarak, somatik melezlemeler yoluyla;

- a) Sitoplazmik erkisirlığın aktarılması ve hibrit ıslahında kullanımı,
- b) Farklı çiçek renklerinin elde edilmesi,
- c) Azot fiksasyonu özelliğinin baklagil olmayanlara aktarılması (özellikle tahıllar ve çok yıllıklar),
- d) Kombine bitkilerin eldesi (Pomato veya Tomapo= domates patates melezi),
- e) Triploid bitki eldesi, bitkilerde yağ ve şeker oranının arttırılması çalışmaları yapılabilir.

Doku kültürüne uygun olmayan fakat ekonomik değeri yüksek olan tür, çeşit veya biyotiplerde doku kültürüne uygunluğu sağlayan genlerin klasik ıslah metotları ile aktarılması, doku kültürü tekniklerini uygulayarak *in vitro* manipulasyon yapılması, hücre kültürleri veya transgenik bitkiler ile çeşitli endüstriyel enzimlerin üretimi, somatik embriyogenez yoluyla sentetik tohum üretimi, özellikle çayır-mera alanlarında kuraklığa dayanıklı bitki tohumlarının çoğaltılması, asimbiyotik *in vitro* çimlendirme, tohum ve fide üretimi (patateste minitüber üretimi vb.), hibrit tohumlarda genotip bozulmadan vegetatif yollarla fide eldesi, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan bitki türlerinin doku kültürü ile korunarak çoğaltılması ve Türkiye’de hücre ve doku bankalarının kurulması, ev imkanları ile “evde doku kültürü” çalışmalarının yapılmaya başlanması gibi konuların hepsi doku kültürünün gelecekte etkili olacağı alanlar olarak gözükmemektedir (Babaoğlu ve ark., 2001).

İlk topraksız üretim şekli olan hidrofonikler (sulu çözeltiler içinde bitkilerin topraksız ortamlarda yetiştirilmesi), tüm bir bitkinin laboratuvar ortamında tam olarak formüle edilmiş besin ortamlarında yetiştirilebilmesi düşüncesini ve daha sonra da bitki organlarının benzer şekilde kültüre alınabilmesi fikrini doğurmuştur. Bu yolda en önemli adımlardan birisi besin ortamlarının geliştirilmesi ve tamamen aseptik şartlarda doku kültüründe kullanılmasıdır. Ayrıca zaman içinde çalışmaların organ ve doku gibi daha büyük parçalardan tek hücre kültürüne doğru yöneldiği görülmektedir. Bunun sonucunda, 1983 yılında bitkilere ilk gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu transferin gerçekleştirilmesinde doku kültürünün kullanılması gerekli olmuştur. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001).

1.1.4. Bitki doku kültürü ile yapılmış çalışmalar

Babaoğlu ve ark., 2001 tarihinde bildirdiğine göre bitki doku kültürü ile yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

1. Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü
2. Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü
3. Somaklonal varyasyon
4. *In vitro* seleksiyon
5. *In vitro* döllenme
6. *In vitro* germplazm muhafazası
7. Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu)
8. Gen transferi
9. Hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü
10. Mikroçoğaltım
11. Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)
12. Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları)
13. Kimeralar

Kültür yöntemi ile hücreler uzun bir süre farklılaşmamış hücre kümeleri veya rejenere olmuş tam bitkiler şeklinde korunabilmektedirler. Doku kültürü çalışmaları sırasında oluşan kallus hücreleri ergin bitki hücrelerine benzememektedirler. Bitki gelişmesi sırasında her biri farklı hücrelere dönüşen, farklılaşmamış meristematik

hücrelere çok benzerler. Kallus farklılaşma ve büyüme farklılığı gösteren düzensiz hücre kümesidir. Besiyerinde yapılan değişiklikler ile tüm bitkiye yeniden farklılaşabilme yeteneği kazandırılabilir. Bitkinin diğer kısımlarının farklılaşırken bazı bölgelerinin meristematik olarak kaldığı, sertleşmenin (sklerifikasyonun) zamanla doku parçalarının ayrı ayrı ölmesine neden olduğu belirtilmiştir (Collin ve Edwards, 1998).

1941 yılında kallus kültürü için yeni bir bileşen olarak hindistan cevizi sütü bulunmuştur. Hindistan cevizi sütü sıvı bir endospermadır. Doğal olarak hücrelere besin sağlar ve aynı zamanda embriyoyu büyüme için uyarır. Kallus kültürlerinden elde edilen sonuçlar, aynı zamanda yabancı hücrelerin de büyümesini uyaran aktif bileşenler içerdiğini göstermiştir (Chang ve Chang, 1998).

Son 25 yıl içerisinde ekonomik değeri yüksek olan bitkilerin doku kültürü ile laboratuvar ortamında üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmalarda göze çarpan bitkiler arasında sebzeler dikkat çekmektedir. Artan nüfus ile birlikte ekim alanlarının azalması bilim insanlarını daha kısa yoldan ürün elde etmeye yöneltmiştir. Bu çalışmaların çoğu ekonomik değere sahip ya da nesli tükenmekte olan bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada ekonomik değeri yüksek bölgesel olarak üretimi dışında üretimi yapılmayan ve nesli tükenmekte olan Beyaz Hıyar'ın laboratuvar ortamında doku kültürü yöntemlerinden organogenez ve somatik embriyogenez yöntemleri kullanılarak çoğaltımı gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Doku kültüründe bitki rejenerasyonu nesli tükenmekte olan bitkilerin laboratuvar ortamında üretilmesi için oldukça cazip ve güncel bir yöntemdir. Bu yöntem ayrıca ekonomik öneme sahip bitkilerin daha hızlı, bol ve kısa sürede verimli üretimi, üreme güçlüğü olan bitkilerin üretimi, bitkilerdeki önemli metabolitlerin endüstriyel boyutta üretimi için de kullanılmaktadır. Doku kültüründe bitki üretimini etkileyen faktörlerin başında ortamda kullanılan büyümeyi düzenleyici maddeler (BDM) gelmektedir. BDM'ler hem kallus oluşumunda hem de adventif sürgün ve kök rejenerasyonunda oldukça önemlidir.

Doku kültüründe bitki rejenerasyonunda önce kallus elde etmek, kallustan fidelerin ve embriyonun rejenerasyonu için bir basamaktır.

Tropikal mısır genotiplerinde, bitki rejenerasyonu ve kallus üretimi ile 113 adet doğal mısır türünün tropikal koşullara uyumları incelenmiştir. Gümüş nitrat kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde gelişen hücre sıralarının 42'sinden bitki rejenerasyonu ve kallus üretimi başarılmıştır. Bunlardan 48 tanesinde kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonunun yüksek kapasitede olduğu saptanmıştır (Carvalho ve ark., 1997).

Bir başka çalışmada buğday bitkisinin 3 ırkında rejenere bitkileri değerlendirilmiş ve buğday kültürlerinin, doku kültürüne yanıtları karşılaştırılmıştır. Üç buğday genotipinin (Bakhtawar-92, Punjab-96 ve İnqılab-91) kallus oluşturma potansiyelleri ve bunların değişik bileşenler içeren besiyerinde rejenerasyonları test edilmiştir. Bakhtawar-92'nin kallus indüksiyonuna en çok karşılık veren genotip olduğu bildirilmiştir. (Farooq ve ark., 2004).

Triticum turgidum Desf. kültürlerinin olgun embriolarından bitki rejenerasyonu, genotip ve kültür besiyerinin kallus oluşumuna etkisi incelenmiştir. Çalışmada 12 buğday bitkisinin *in vitro* doku kültürüne verdiği yanıtlar değerlendirilmiştir. Dört farklı MS besiyerinde, zigotik olgun embriolarda, kallus oluşumu değerlendirilmiştir. Her bir genotip ve besiyeri tipine göre kallus oluşturma oranları incelenmiştir. Kallusun, her bitki türüne göre kompakt, embriyonik, yumuşak veya sulu olduğu bulunmuştur. Bu oranların genotip ve besiyerine bağlı olarak %54 ve %100 arasında olduğu açıklanmıştır. Besiyeri içeriği ve genotipe bağlı olarak, yumuşak

kallusla kıyaslandığında, sert bir kallustan bitkilerin rejenerasyonunun daha fazla gerçekleştiği açıklanmıştır. En iyi sert kallus oluşumu veren ve bitki rejenerasyonun en iyi şekilde gerçekleştiği modifiye edilmiş farklı MS türevlerin olduğu ifade edilmiştir. (Gonzalez ve ark., 2001).

Domates (*Lycopersicon esculentum* L., c.v. Roma) *in vitro* fidelerinin değişik eksplantları kullanılarak rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Kallus indüksiyonu ve rejenerasyon için eksplant olarak, domatesin hipokotilleri ve yaprak diskleri kullanılmıştır. Farklı büyüme düzenleyicileri kullanıldığında, domatesin yaprak diskleri ve hipokotillerinin kültüre farklı yanıtlar verdiği görülmüştür (Chaudhry ve ark., 2004).

Sanchez-Donaire ve ark., (2000) tarafından *Cucurbitaceae* familyası üyesi 16 karpuz genotipinde rejenerasyonu araştırılmıştır. Araştırmacılar *in vitro* kültürde, 4-6 hafta sonra genotip başına eksplant sayısı ile kallus oluşturan eksplant sayısı, rejeneratif potansiyele sahip yapıdaki eksplantların sayısı, sürgün veren eksplantların sayısını tespit etmişlerdir. Çimlenmeden 5 gün sonra alınan eksplantlarda % 71.4 oranında, tozlanmadan 28 gün sonra alınan eksplantlarda ise % 100 oranında rejenerasyon elde etmişlerdir.

Bitki rejenerasyonu için bitkinin genotipi önemli olmakla beraber eksplant tipi de önemli yer tutar eksplant tipi ilgili yapılmış bir çok çalışma mevcuttur.

Han ve ark., (2004) tarafından *in vitro* koşullarda çimlendirilen su kabağı (*Lagenaria siceraria* Standl.) fidelerinin kotiledonlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, organogenez yoluyla, etkili bir rejenerasyon sistemi belirtilmiştir. Çalışmalarında, 6 farklı genotip (Partner, New, FR-OK, FR-Dantes, G5), BDM olarak ise BA, NAA ya da IAA, aynı zamanda bir etilen inhibitörü olan AgNO₃'ünde etkisini araştırmışlardır. En uygun rejenerasyonun 4-gün-yaşlı fidelerin 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullarda 3 mg/l BA ve 0.5 mg/l AgNO₃ kullanıldığında elde edildiği belirlenmiştir.

Chee (1991), *Cucurbita pepo* L., cv. YC 60'ın doku kültüründe bitki rejenerasyonunu incelemiş ve çalışma sonuçlarında, rejenere bitkilerin, morfolojik olarak normal görüldüğünü ve üremenin normal olduğunu gösteren tohumlar ile meyveler oluştuğunu açıklamıştır.

Abriea ve Staden (2001), *Cucurbitaceae*'nin beş kültüründe kök rejenerasyon yöntemleri araştırılmıştır. Kotiledon eksplantlarında, kültür besiyerindeki 6-Benzil adenin (BA), kinetin, İzopentil adenin (IP) ve İndol asetik asit (IAA) içeren Thidiazuran

(TDZ) kombinasyonlarının kök rejenerasyonlarına etkileri test edilmiştir. Kültür yapmak için, *C. maxima* cv. A-line, *C. maxima* cv. Chicago Warded ve *C. pepo* cv. Rolet kullanılmıştır. Uygulamaların hiçbirinde kök oluşmadığı görülmüştür. Ancak *C. maxima* cv. Chicago Warded eksplantlarında somatik embriyolar oluşmuştur. *Cucumis melo* cv. Hales Best 36'da rejenerasyon yeteneğinin yüksek olduğu ve sitokinin içeren her konsantrasyonda kök oluşumu gözlemlendiği açıklanmıştır.

Cucurbitaceae familyası türlerinde rejenerasyonla ilgili ilk bilgi kavunda Abak ve Dumas de Vaulx (1980) tarafından verilmiştir. Araştırmacılar, kavunda hipokotil ve çiçek saplarını eksplant olarak kullanarak kallus, daha sonra da kallustan sürgün uyartımına çalışmışlardır. Araştırmada MS temel besin ortamına kinetin ve NAA ilave edilerek kallus ve bu kalluslardan da iki hafta içinde sürgün oluşturulmuştur.

Moreno ve ark. (1985), tarafından 11-13 günlük kavun fidelerinin kotiledon ve hipokotil eksplantlarını, IAA ve kinetin içeren ortamlarda kültüre alarak rejenerasyon yeteneklerini incelemişler, eksplant kaynağı ve kültür ortamı koşullarına bağlı olarak, kavun dokularının hem organogenez hem de embriyogenez yoluyla morfogeneze uğrayabildiğini gözlemişlerdir.

Trulson ve Shahin (1986) tarafından hıyar bitkisinde yapılmış olan *in vitro* rejenerasyon çalışmasında, 'Straight Eight' çeşidine ait 5 günlük fidelerin kotiledonları ve kökleri eksplant kaynağı olarak kullanılırken; kotiledon diskleri ve kök parçaları embriyo gelişimini uyarmak amacı ile 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren yarı katı MS ortamında kültüre alınmıştır. Kotiledon eksplantlarında sarımsı yeşil embriyoların olduğu gözlenirken kök dokusunda embriyo uyartımı 3-4 hafta sonra belirlenmiştir.

Wehner ve Locy (1981) tarafından hıyarın rejenerasyonu ile ilgili ilk çalışmalardan birisi yapılmıştır. 85 çeşide ait 7 günlük fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantları alınarak 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında 45 gün kültüre alınmıştır. Her bir kallus parçasından gözlenebilen sürgün ve kök sayısı kaydedilmiştir. Hipokotil dokusundan sürgün oluşumu gözlenmezken, kotiledon dokusundan % 33 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir.

Novak ve Dolezelova (1982), 5 farklı hıyar çeşidinin *in vitro* doku kültüründe büyüme ve farklılaşması üzerine hormon etkisini araştırmışlardır. 8 günlük fidelerin kotiledonlarından kallus dokusu oluşturmak üzere IAA, BAP, NAA, Kinetin ve 2,4-D

hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile karanlık ve aydınlık denemesi uygulanmıştır. IAA uygulamasının gerek karanlık gerekse aydınlık ortamda yalnız kök oluşturduğu, uzun süreli kallus oluşumunda en uygun NAA ve BAP kombinasyonunun olduğu, düşük NAA ve BAP konsantrasyonlarında kök ve sürgün oluşumunun meydana geldiği bildirilmiştir.

Selveraj N. ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmada hıyar bitkisinde organogenez incelenmiştir. Beş günlük kotiledon eksplantlarında yaklaşık %86.2 oranında organogenik kalluslar elde edilmiştir. Adventif sürgün oluşumu için organogenik kalluslar NAA (1.34 μ M), BAP (8.88 μ M), Zeatin (0.91 μ M) ve L-glutamin ile birlikte MS ortamına 20 gün aralıklarla aktarılmış ve %75.6 oranında sürgün çoğaltımı meydana geldiği rapor edilmiştir.

Usman Muhammed ve ark. (2011), hıyar yapraklarında somatik embriyogenez ve sürgün rejenerasyonu başlatmışlardır. MS ortamına 2,4-D (2mg/l), NAA ve BAP (1.5mg/l) eklenerek yaprak disklerinde maksimum kallus başlangıcı %94.16 ve %76 oranında gözlemlenmiştir. Sırasıyla, kotiledon eksplantında maksimum kallus %77 oranında 4.0 mg/l BAP + 0.75 mg/l NAA desteği ile başarılmıştır. Kallus başlangıcı en üst seviyede 2,4-D (5mg/l) yaprak disklerinden elde edilmiştir.

Selveraj ve ark., (2006) hıyarda *in vitro* organogenez oluşumunu incelemiş, hipokotil eksplantından organogenez başarılmıştır. 7 günlük hipokotil eksplantları MS ortamına 87.64 μ M sukroz, %0.8 Agar, 2,4-D (3.62 μ M) ve BAP (2.22 μ M) ile birlikte eklenerek kallus başlangıcı sağlanmıştır.

Doku kültürünü etkileyen faktörler göz önüne alındığında bitkinin genotipi yada eksplant kaynağının dışında kullanılan BDM'lerde önemli ölçüde etki etmektedir.

Raharjo ve Punja, 1993'te turşuluk hıyardan embriyogenik süspansiyon kültürlerinde fidan rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yaprak sapı eksplantında oluşan Embriyogenik kalluslar 2,4-D (5 μ M) ve BAP (5 μ M) ile desteklenmiş MS ortamında embriyogenik süspansiyon kültürüne alınmış bu süspansiyon kültürlerini muhafaza etmek için çeşitli BDM'ler (2,4-D (1 μ M) ve BAP (1 μ M)) ile desteklenmiş MS ortamı kullanılmıştır. Oluşan sarı kırılğan kalluslar daha sonra alt kültürlerle alınarak çeşitli konsantrasyonlarda oksin ve sitokin etkileri araştırılmıştır. En yüksek sürgün ve fide rejenerasyonu NAA/BAP ile desteklenmiş MS ortamında konsantrasyon olarak da 2/1 ve 1/1 olarak elde edilmiştir.

Gambley ve Dodd (1990), tarafından kotiledon eksplantlarından rejenerasyon elde etmek amacıyla, farklı sitokininler (BAP, kinetin, İzopentil adenin (2iP)) ve oksinler (IAA ve NAA) denemişlerdir. Tüm sitokininlerden sürgün elde edilmesine rağmen en uygun sitokininin Kinetin (2 mg/l) olduğu tespit edilmiş ve eksplant büyüklüğü denemesinde yine bu hormon kullanılmıştır. Oksin varlığında, kallus oluşumu gözlenirken, sürgün gelişimi saptanamamıştır. Eksplantlar küçük parçalara kesilerek kültüre alındığında, eksplant üzerinde gelişen sürgün sayısının arttığı bildirilmiştir.

Urbanek ve ark., (2005) tarafından Styrian Kabağı'nda (*C. pepo* L.subsp. *Pepo* var. *Styriaca* Greb.) rejenerasyon somatik embriyogenez yoluyla başarılmıştır. Styrian kabağının kotiledon eksplantlarından, 16.11 μ M NAA ve 4.44 μ M Naftelen bütirik asit (NBA) veya 26.85 μ M NAA ve 13.32 μ M NBA içeren sıvı MS besiyeri kullanılarak, somatik embriyo oluşumu sağlanmıştır. Besiyerine 26.85 μ M NAA ve 13.32 μ M NBA eklendiğinde kallus oluşumu daha çabuk gerçekleşmiştir. Aksine, büyüme düzenleyicilerin (16.11 μ M NAA ve 4.44 μ M NBA) daha düşük konsantrasyonlarında embriyogenik oluşum daha fazla olmuştur. Embriyo gelişimi için gereken sürenin besiyeri bileşenleri ile ilgili olmadığı açıklanmıştır. En yüksek çimlenme 11.42 μ M IAA içeren besiyerinde kültüre alınan embriyolarda gözlenmiştir.

Ekonomik bir öneme sahip olan Beyaz Hıyar ülkemizde Güney Doğu bölgesinde yetiştirilmektedir. Beyaz Hıyar üzerinde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Her ne kadar *Cucurbitaceae* familyası ile yapılan çalışmalarda her yöntem için (somatik embriyogenez, organogenez, sürgün ve kök gelişimi v.b.) belirlenmiş protokoller olsa da her bir genotipin BDM çeşidi konsantrasyonu ve kombinasyonu, eksplant çeşidi, ortam çeşidi ve kültür koşulları farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle Beyaz Hıyar'ın hem neslinin devamı hem de ticari anlamda kitlesel üretimi için daha önce yapılan çalışmaların öncülüğünde Beyaz Hıyar için uygun organogenez ve somatik embriyogenez protokolleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Teşhisi

Bitki tohumları Şırnak Merkez Geçitboyu Köyü'nden toplanarak laboratuarda saksıya ekimi yapılmıştır. Bitki çiçeklenme evresinden sonra Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Fevzi ÖZGÖKÇE tarafından teşhis edilerek F.18345 kodu ile herbaryum kayıtlarına alınmıştır.



Şekil 3.1. Tabii ortamda yetiştirilen Beyaz Hıyar.

3.2. Sterilizasyon

3.2.1. Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu

Kullanılan petri, erlen ve beher gibi cam malzemeler ile pens, bisturi gibi metal malzemeler 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C de 60-90 dakika tutularak sterilizasyonları sağlanmıştır.

3.2.2. Besin ortamının sterilizasyonu

Çalışmada, kullanılan besin ortamlarının sterilizasyonu 1,5 atmosfer basınç altında 120 °C de ortam hacmine bağlı olarak 20-30 dk gibi değişik sürelerde sağlanmıştır.

3.2.3. Tohumların sterilizasyonu

Beyaz Hıyar tohumlarının yüzey sterilizasyonu % 15 ticari çamaşır suyu (ACE-Türkiye, % 40 NaOCl) ile 15 dakika muamele edilmiştir. Bu süre sonunda hıyar tohumları 5 defa steril saf sudan geçirilerek durulanmıştır. Çeşitli sterilizasyon yöntemleri içerisinde bu uygulamanın kontaminasyon riskini azalttığı ve tohuma en az düzeyde zarar verdiği tespit edilmiş ve çalışma boyunca bu sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır.

3.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Uygulamalarda kullanılan ve hazır besin ortamları (MS, B5, SH) mineral tuz ve vitaminler ile % 3 sukroz ve % 0.6 agar (Duchefa) katılaştırılarak elde edilmiştir. Ortam hazırlamada çift distile saf su kullanılmış olup, besin ortamına farklı konsantrasyonlarda BDM ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı, 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır.

Tüm kültürler çalışmanın amacına bağlı olarak 24 saat veya 16/8 saat fotoperiyotta beyaz florasın ışıkta ve tohumların temin edildiği Şırnak yöresinin Haziran-Temmuz sıcaklık ortalaması olan 22-27 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

3.4. Büyüme Düzenleyici Maddeler (BDM)

Çalışmada kullanılacak BDM'ler uygun çözücülerde çözündürüldükten sonra stok çözeltiler 1g/l olarak hazırlanmıştır. Çalışmanın amacına uygun konsantrasyonlarda ayarlanarak ortama ilave edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonlar 4 °C de saklanmıştır.

3.5. Beyaz Hıyarların *In Vitro*'da Çimlendirilmesi

Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril cam kavanozlar içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.6 (Duchefa) agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 25 ± 2 °C de çimlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan eksplantlar tohumların çimlenmesinden sonra gelişen fidelerden sağlanmıştır.

3.6. Genel Doku Kültürü Şartları ve Besin Ortamlarının Hazırlanması

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış, bunun için steril kabin kullanılmıştır. Kullanılan bisturi bıçağı ve pensler önceden steril edilmiş ve kesim işlemi sırasında da % 96'lık etil alkole batırılıp steril koşulların devamı sağlanmıştır. Besin ortamları kullanım amacına göre ya tüplere 40 ml olacak şekilde doldurularak otoklav edilmiş, ya da erlenler içerisinde otoklav edildikten sonra steril petri kutularına steril kabin içerisinde 20–25 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. MS, SH, B5 ortam reçetelerine göre mineral tuzların ve vitaminlerin isim ve konsantrasyonları çizelge 3.1'de verilmiştir.

3.7. *In Vitro*'dan Elde Edilen Beyaz Hıyar Fidelerinden Bitki Eksplantlarının İzolasyonu

Bitki eksplantları steril şekilde yetiştirilen fidelerden elde edilmiştir. Bu eksplantlar birkaç mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 90 x 15 mm steril petri kutularında uygun ortamlarda farklı BDM eklenerek 16/8 ışık/karanlık foto periyodunda $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ flüoresans ışıklandırmasında iklim dolabında (Fitotron, Sanyo, Gellenkamp PLC, UK) inkübe edilmiştir. Tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerden alınan Beyaz Hıyar tohumları yüzey sterilizasyonuna tabii tutulmuştur. Doku kültürü ile ilgili bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin içerisinde yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hazır temel besin ortamları ve içerikleri

komponentler	Kültür ortamındaki konsantrasyonu (mg/l)		
	MS	B5	SH
KNO ₃	1900	2500	2500
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	200
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-
KCl	-	-	-
KH ₂ PO ₄	170	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	-	-
KI	0.83	0.75	1.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	5.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	1.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	15.00
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	20.00
Nikotinik Asit	0.5	1.0	5.0
Pirotoksin-HCl	0.5	1.0	0.5
Thiamine-HCl	0.1	10	5.0
Myo-Inositol	100	100	1000
Glisin	2.0	-	-
Sakkaroz	30000	20000	30000

3.8. BDM'lerin Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Belirlenmesi

Etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturarak kallus gelişimini sağlamak amacı ile standart ortamlar içerisine Çizelge 3.2'de belirtilen çeşitli BDM'lerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları eklenmiştir. Her uygulamada 4 petri kullanılırken, bir petride 5 eksplant kültüre alınmıştır. Eksplantların kotiledon, yaprak, yaprak sapı ve hipokotil kullanılmıştır. Büyütme odasında 16 saatlik fotoperyotta 25 ± 2 °C'de kültüre alınan eksplantlardan 4 hafta gibi bir sürede tomurcuk, sürgün, kök ve kallus gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.2. BDM'lerin konsantrasyon ve kombinasyonları

BDM'ler	Konsantrasyonları (1mg/l)
NAA	0,5 mg/l
NAA	1 mg/l
NAA	1,5 mg/l
NAA	2 mg/l
2,4-D	0,18 mg/l
2,4-D	0,2 mg/l
2,4-D	0,25 mg/l
2,4-D	0,3 mg/l
2,4-D	0,35 mg/l
2,4-D+BAP	1,5 mg/l + 0,5 mg/l
BAP	1 mg/l
IAA	1 mg/l
IAA+BAP	0,5 mg/l + 0,5 mg/l
IAA+BAP	0,5 mg/l + 1 mg/l
IAA+BAP	0,1 mg/l + 0,5 mg/l

4. BULGULAR

4.1. Sürgün Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

Çalışmada ilk önce en uygun besiyeri ortamını (MS, B5,SH) tespit etmek amacı ile eksplantlar steril hava akışlı kabin içerisinde kesilerek BDM'lerle desteklenmiş MS, B5, SH ortamlarına alınmıştır. MS, B5, SH'li ortamlarda sürgün oluşum sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'deki yüzdelik oranlar; ekilen eksplantlardan sürgün oluşturanların toplam eksplantlara oranı olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. Sterilize edilen tohumlardan, BDM'siz MS ortamında yetiştirilen fideler.

Çizelge 4.1. Sürgün Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

ORTAMLAR	BDM'LER (1mg/l)	EKSPLANTLAR			
		Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Kotiledon
MS	NAA	%47	-	-	%38
	BAP	%24	-	%100	-
	2,4-D	%10	%17	%38	-
	IAA	-	-	%33	-
B5	NAA	%32	-	-	-
	BAP	%21	%8	%67	-
	2,4-D	%15	%10	%29	-
	IAA	-	-	%17	-
SH	NAA	%41	-	-	-
	BAP	%27	-	%71	-
	2,4-D	%13	%12	%35	-
	IAA	-	-	%41	-

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi uygulanan ortam, BDM’ler ve eksplantlar içerisinde sürgün gelişimi için 1mg/l BAP ile desteklenmiş B5 ortamında hipokotil eksplantında %67 oranında sürgün gelişimi gözlenirken 1mg/l BAP ile desteklenmiş SH ortamında hipokotil eksplantında %71 ve 1mg/l NAA ile desteklenmiş yaprak eksplantında %41 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir. En iyi sonuç ise 1mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamında hipokotil eksplantında %100 oranında ve 1mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında yaprak eksplantından %47 oranında elde edilmiştir.

4.2. Kök Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

Hıyar bitkisinden alınan farklı eksplantların kök geliştirme kapasitelerinin belirlenmesi için farklı ortamlar (MS, SH, B5) ve BDM’ler kullanılmış ve kök geliştirme kapasiteleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kök Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

ORTAMLAR	BDM'LER (1mg/l)	EKSPLANTLAR			
		Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Kotiledon
MS	NAA	-	-	-	-
	BAP	-	-	-	-
	2,4-D	-	-	-	-
	IAA	%70	%76	%100	%68
B5	NAA	-	-	-	-
	BAP	-	-	-	-
	2,4-D	-	-	-	-
	IAA	%49	%66	%82	%48
SH	NAA	-	-	-	-
	BAP	-	-	-	-
	2,4-D	-	-	-	-
	IAA	%64	%71	%88	%57

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi 1mg/l IAA eklenmiş SH ortamında hipokotilde %88, yaprak sapında %71, yaprakta %64 ve kotiledonda ise %57 oranında köklenme gözlenmiştir. 1mg/l IAA ile desteklenmiş B5 ortamında ise yaprak sapında %66 ve hipokotil eksplantında %82 oranında kök gelişimi görülmüştür. 1mg/l IAA eklenmiş MS ortamında ise hipokotilde %100, yaprak sapında %76 ve yaprak eksplantında %70 oranında kök gelişimi saptanmıştır.

4.3. Kallus Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

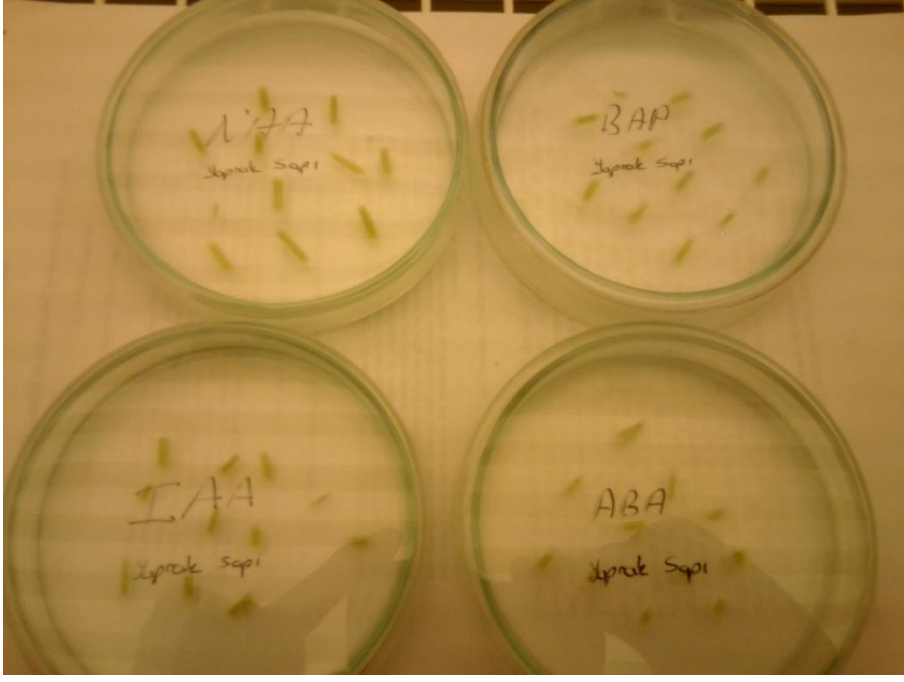
Hıyar bitkisinden alınan eksplantların kallus geliştirme kapasitelerinin belirlenmesi için farklı ortamlar (MS, SH, B5) ve çeşitli BDM’ler kullanılmış kallus geliştirme kapasiteleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kallus Gelişimi Üzerine Farklı BDM, Kültür Ortamı ve Eksplantların Etkisi

ORTAMLAR	BDM'LER (1mg/l)	EKSPLANTLAR			
		Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Kotiledon
MS	NAA	%53	-	%100	%33
	BAP	%33	%28	%100	-
	2,4-D	%17	%22	%45	%44
	IAA	-	-	%15	-
B5	NAA	%45	-	%77	%24
	BAP	%20	%19	%80	-
	2,4-D	%13	%21	%47	%38
	IAA	-	-	-	-
SH	NAA	%37	-	%67	%25
	BAP	%16	%14	%73	-
	2,4-D	%10	%20	%43	%28
	IAA	-	-	-	-

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi 1mg/l BAP ilave edilmiş SH ortamında hipokotilde %73, 1mg/l BAP'la desteklenmiş B5 ortamında hipokotilde %80, 1mg/l NAA ile desteklenmiş hipokotilde %77 oranında kallus gelişimi gözlenirken MS ortamında ise 1mg/l BAP ve NAA'de hipokotil eksplantında %100 oranında kallus gelişimi gözlenmiştir. En başarılı ortamın MS olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.2'de eksplantlar besi ortamlarına farklı BDM'ler kullanılarak dikimi yapılmıştır.



Şekil 4.2. Eksplantların besi ortamlarına ekimi.

Uygulama sonucunda hipokotil eksplantında 1 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınan toplam eksplant sayısının tamamında kallus oluşumu gözlenirken sürgün oluşumunun yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). 1mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantının tamamında önce kallus, daha sonra sürgün oluşumu gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı BDM’ler ile desteklenmiş MS ortamında hıyar bitkisinin farklı eksplantlarının kallus geliştirme kapasiteleri

Eksplant	BDM(1mg/l)	Kök oluşumu	Sürgün oluşumu	Kallus
Yaprak	NAA	-	%47	%53
	BAP	-	%24	%33
	IAA	%70	-	-
	ABA	-	-	-
Yaprak sapı	NAA	-	-	-
	BAP	-	-	%34
	IAA	%76	-	-
	ABA	-	-	-
Kotiledon	NAA	-	%38	%33
	BAP	-	%45	%37
	IAA	%68	-	-
	ABA	-	-	-
Hipokotil	NAA	-	-	%100
	BAP	-	%100	%100
	IAA	%100	%33	%15
	ABA	%50	%50	-

Çizelge 4.4’de anlaşılabacağı üzere hipokotil eksplantında NAA ilave edilmiş MS ortamında %100 kallus oluşumu gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.5. MS ortamında farklı BDM kullanılarak eksplantların kallus oluşturma potansiyelleri

Eksplant	Kullanılan BDM (1mg/l)			
	NAA	BAP	IAA	ABA
Yaprak	%50	-	-	-
Yaprak Sapı	%10	%50	50	-
Kotiledon	-	-	%20	-
Hipokotil	%100	%100	%50	-

1 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmış olan kotiledon eksplantları üzerinde %45 oranında sürgün oluşumu, %37 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı ortam üzerinde hipokotil eksplantları kültüre alındığında sürgün ve kallus oluşumunun %100 olduğu görülmüştür. Yine aynı BDM ile kültüre alınan yaprak

eksplantlarında sürgün oluşumu %24 oranında iken kallus oluşumu %33 oranında görülmüş, yaprak sapı üzerinde kültüre alındığında ise %34 oranında kallus oluştuğu gözlenmiştir.

4.4. Organogenik Kallus Oluşumu

Çalışmada hipokotil eksplantı 1 mg/l BAP içeren MS ortamına dikildikten 7 gün sonra önce kallus oluşturmuş daha sonra sürgün gelişimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.3 a ve b).



Şekil 4.3. a 1mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında kallus ve sürgün oluşumu.



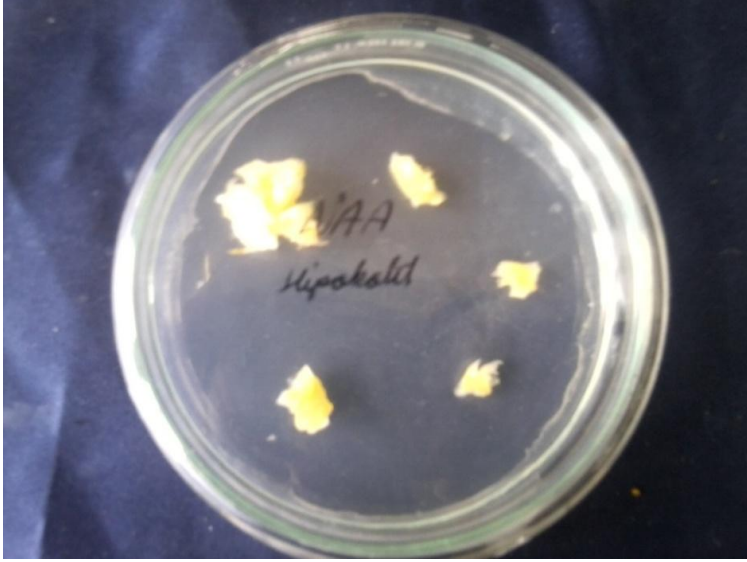
Şekil 4.3. b 1mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında kallus ve sürgün oluşumu.

NAA içeren MS ortamına dikilmiş hipkotil eksplantından oluşan kallus Şekil 4.4' de sunulmuştur.



Şekil 4.4. a 1mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu.

En üretken organogenik kalluslar 1-2 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişmiştir (şekil 4.4 a, b ve c).



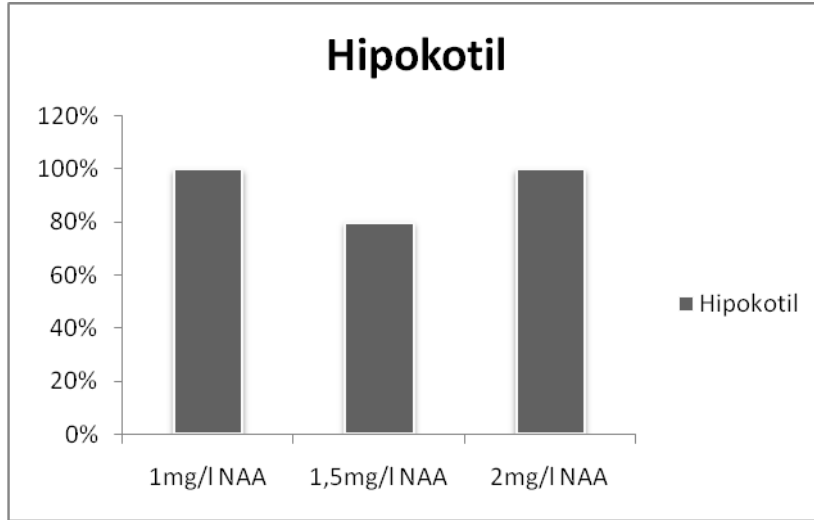
Şekil 4.4. b 1mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu.



Şekil 4.4. c 1mg/l NAA içeren MS ortamında kallus oluşumu.

1 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmış olan kotiledon eksplantlarında %33 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı ortamda kültüre alınan hipokotil eksplantlarında ise %100 oranında kallus oluştuğu, yine aynı ortamda kültüre alınan yaprak eksplantları da %47 oranında sürgün oluşumu, %53 oranında kallus oluşumu meydana gelirken yaprak sapı eksplantı aynı ortamda kültüre alındığında herhangi bir gelişim göstermemiştir (Çizelge 4.4).

Hipokotilde en iyi kallus gelişimi NAA içeren MS ortamında görüldüğü için NAA'nın farklı konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmalarda (1 mg/l NAA, 1.5 mg/l NAA ve 2 mg/l NAA) kallus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca kallus oluşumunun yanı sıra kök gelişimi de 1 mg/l NAA'de saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. NAA'nın farklı konsantrasyonlarında hipokotilde kallus oluşumu.

1 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alınmış olan kotiledon eksplantlarında %68 oranında kök oluşumu gözlenmiştir. Aynı ortamda hipokotil eksplantları kültüre alındığında sürgün oluşumunun %33, kallus oluşumunun %15, kök oluşumunun ise %100 olduğu görülmüştür. Yine aynı ortamda kültüre alınan yaprak eksplantları %70 oranında kök oluşumu görülmüş yaprak sapı eksplantı kültüre alındığında ise %76 oranında kök gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Organogenik kallusları elde etmek için IAA ve BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. 1 mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotil eksplantında kök ve yaprak gelişimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.6 a ve b).



Şekil 4.6. a 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök ve yaprak gelişimi.



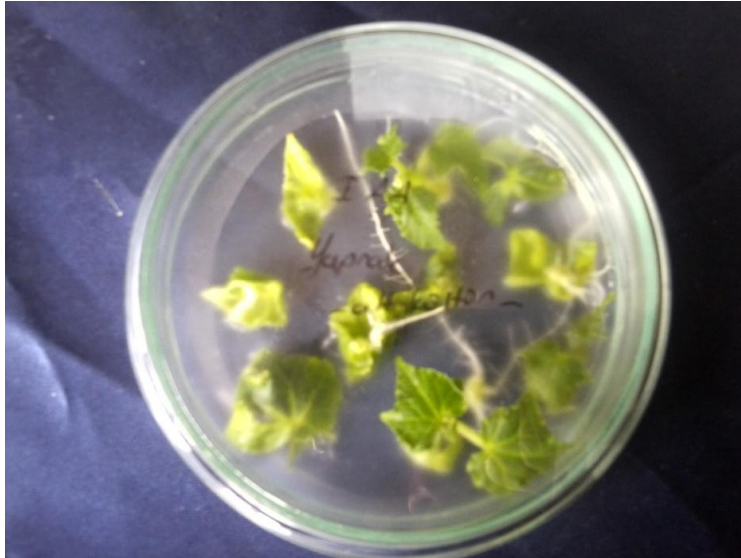
Şekil 4.6. b 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök gelişimi.

1mg/l IAA içeren MS ortamında yaprak sapı eksplantında kök gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 1mg/l IAA içeren MS ortamında yaprak sapında kök gelişimi.

Yaprak eksplantı 1 mg/l IAA içeren MS ortamına alındığında kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.8).

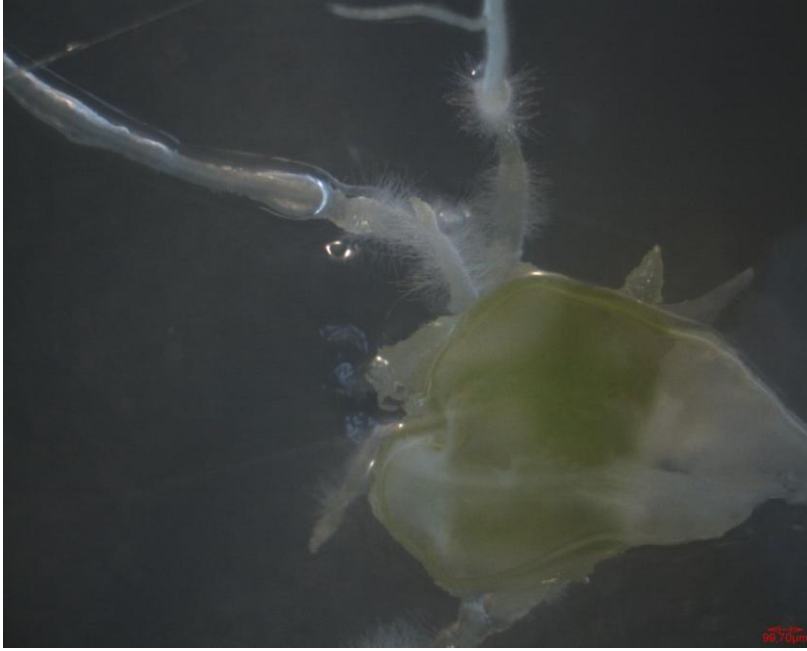


Şekil 4.8. 1mg/l IAA içeren MS ortamında yaprakta kök gelişimi.

1mg/l IAA içeren MS ortamına alınan kotiledon ve hipokotilde kök gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

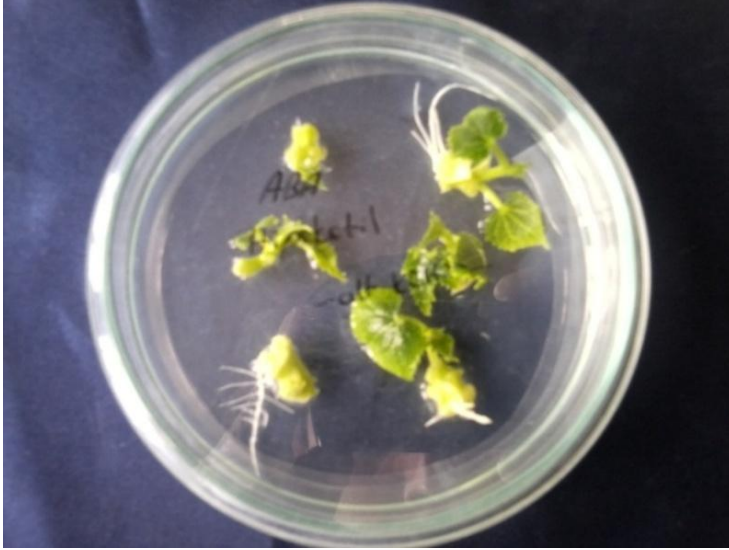


Şekil 4.9. 1mg/l IAA içeren MS ortamında kotiledonda kök gelişimi.

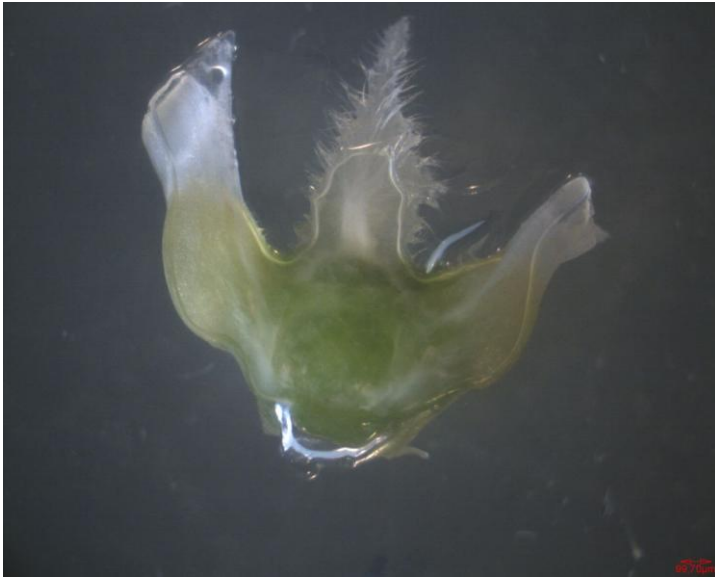


Şekil 4.10. 1mg/l IAA içeren MS ortamında hipokotilde kök gelişimi.

1mg/l ABA içeren MS ortamında kotiledon, yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantları kültüre alındığında kotiledon, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında sürgün ve kök gelişimi gözlenmezken hipokotil eksplantında %50 oranında kök gelişimi ve aynı oranda sürgün gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.11 a ve b).



Şekil 4.11. a 1mg/l ABA içeren MS ortamındaki hipokotilde kök ve yaprak gelişimi.



Şekil 4.11. b 1mg/l ABA içeren MS ortamında hipokotil eksplantında kök gelişimi.

15 günlük hipokotil eksplantları BDM kullanılmadan MS ortamına alındığında 7 günün sonunda hipokotil eksplantlarında kök ve sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.12 a ve b).

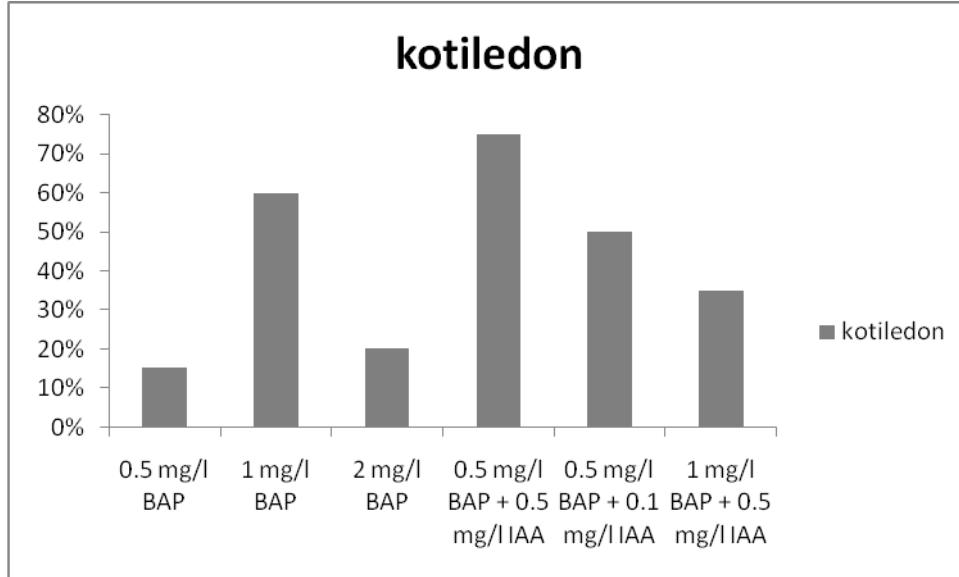


Şekil 4.12. a BDM'siz MS ortamında hipokotil eksplanttan kök ve sürgün oluşumu.



Şekil 4.12. b BDM'siz MS ortamında hipokotil eksplanttan kök ve sürgün oluşumu.

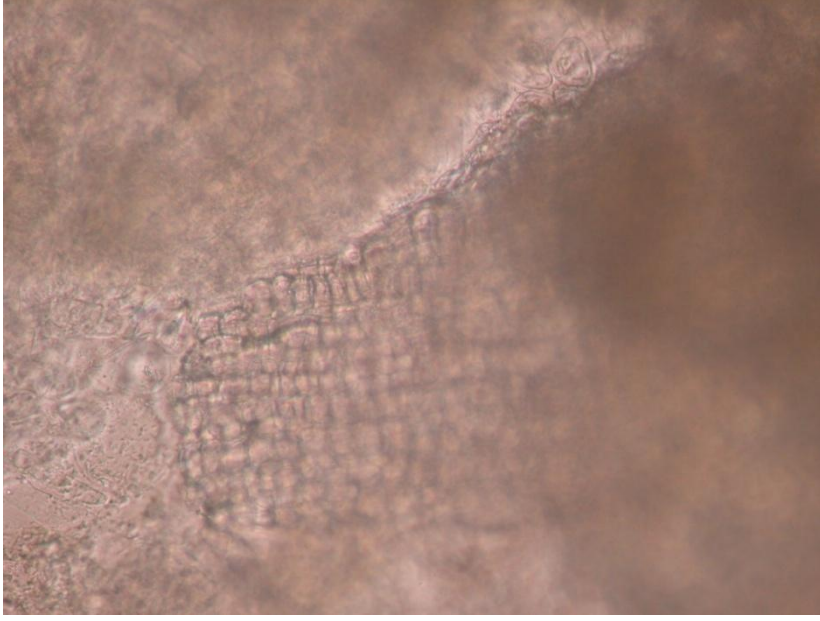
Bu bitki ile yapılan organogenez çalışmalarında eksplant olarak genellikle kotiledon kullanıldığından dolayı hipokotil uygulamalarından sonra çalışmalar kotiledon üzerine yoğunlaşmış ve kotiledonlar şu ortamlara dikilmiştir; 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA, 0.5 mg/l BAP + 0.1mg/l IAA. 10 günün sonunda dikilen eksplantlardan elde edilen adventif kök ve sürgün miktarları dikilen toplam eksplantlara oranlanarak yüzde olarak organogenez hesaplanmıştır. Kotiledonda organogenezin en verimli olduğu protokol olarak 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA ile desteklemiş MS ortamı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



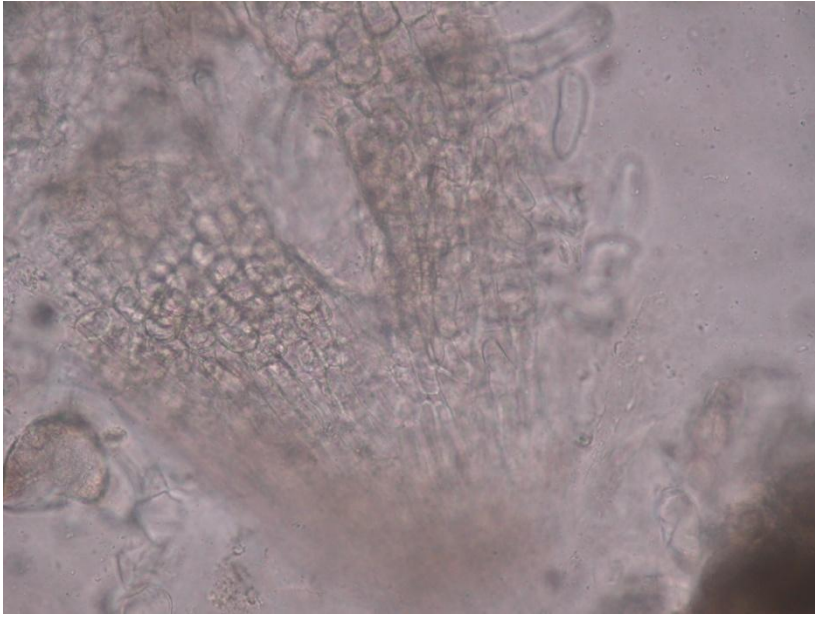
Şekil 4.13. Kotiledonda organogenez oluşumu.

4.5. Adventif Kök Gelişimi

Yaprak eksplantı 1 mg/l NAA içeren MS ortamına alınmış ve 7 günün sonunda yaprak eksplantında kallus gelişimi gözlenmiştir. Kalluslar mikroskop altında incelendiğinde yaprak eksplantında kök promordiyumun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14 a ve b).



Şekil 4.14. a Yaprakta adventif kök promordiyumu.



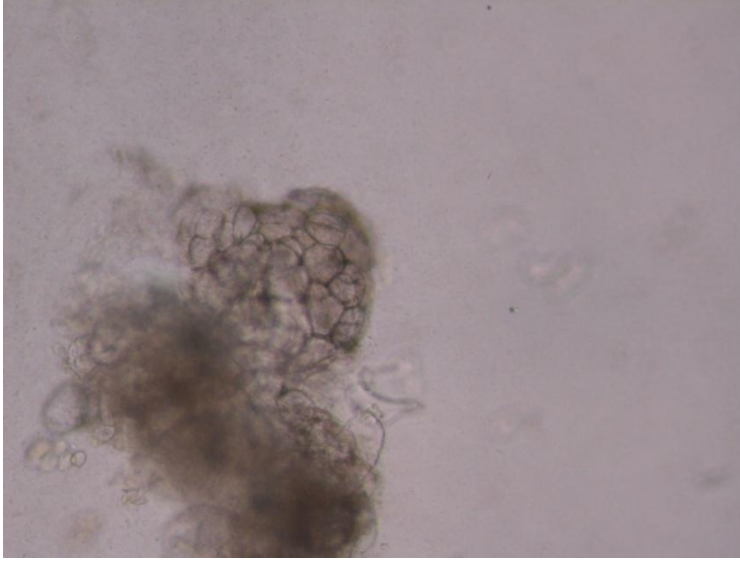
Şekil 4.14. b Yaprakta adventif kök promordiyumu.

4.6. Somatik Embriyo Oluşumu

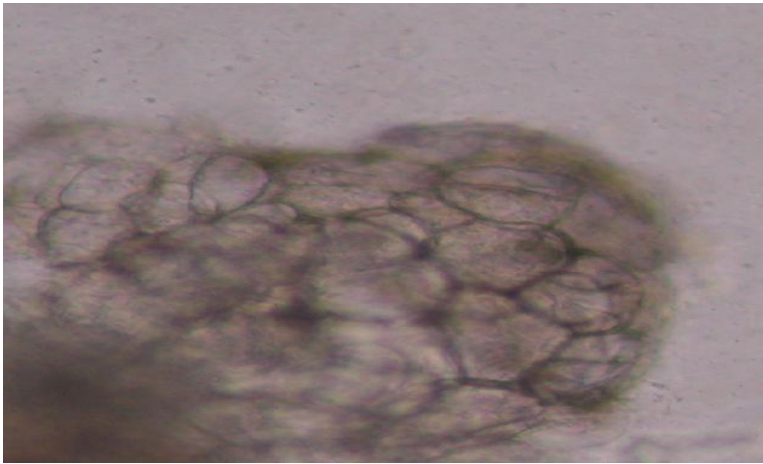
Hipokotil eksplantı 1 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında kallus oluşturmuş oluşan kallus bisturi yardımıyla sıyrılarak 1mg/l 2,4-D, 1.5mg/l 2,4-D ve 2mg/l NAA

ortamlarına transfer edilmiştir. 10 günün sonunda mikroskop altında incelenen hücrelerde proembriyo, 18. günde globular embriyo ve 35. günde kalp şeklindeki embriyolar tespit edilmiştir. Embriyogenik dokular BDM ilave edilmeyen MS ortamlarında sıvı kültüre transfer edilmiş ve çalkalayıcıda 16/8 fotoperiyotda 25 ± 2 °C de 2 hafta inkübe edildikten sonra örneklerden çok az miktarda alınarak mikroskop altında incelenmiş ve torpedo şeklindeki embriyogenik yapılar gözlenmiştir.

Somatik embriyogenezin ilk gelişim evresi olan proembriyo oluşumu 10. günün sonunda mikroskop altında incelenerek gözlenmiştir (Şekil 4.15 a ve b).

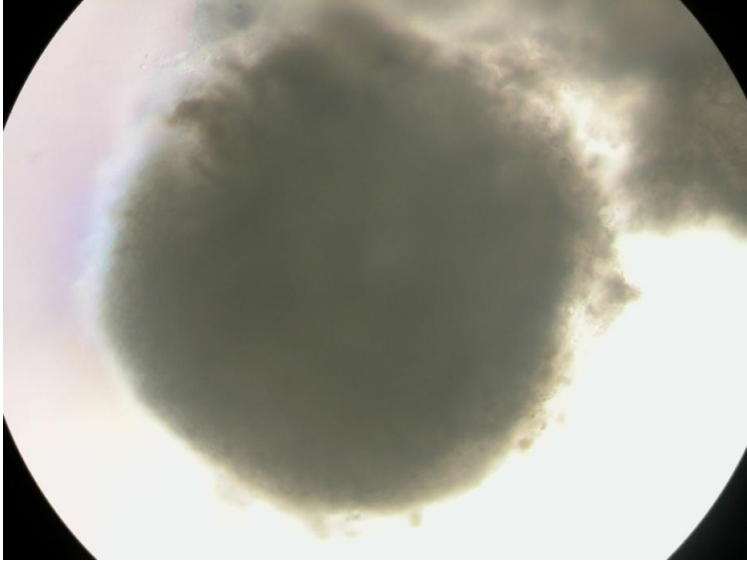


Şekil 4.15. a Proembriyo şeklindeki hücre topluluğu.

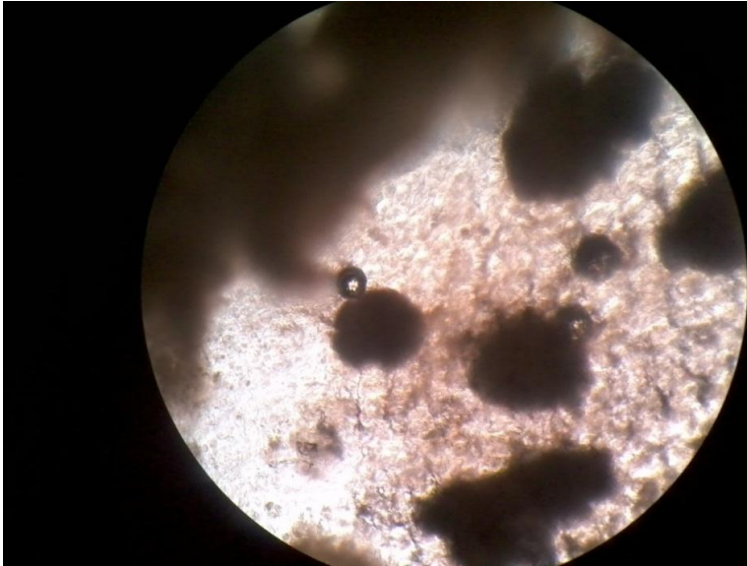


Şekil 4.15. b Proembriyo şeklindeki hücreler.

18. günde hücreler mikroskop altında incelenerek proembriyo hücreleri olgunlaşarak globular şeklinde embriyogenik hücreleri oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.16 a, b ve c).



Şekil 4.16. a Globular şeklindeki embriyonik yapı.



Şekil 4.16. b Globular şeklindeki embriyonik kümeler.

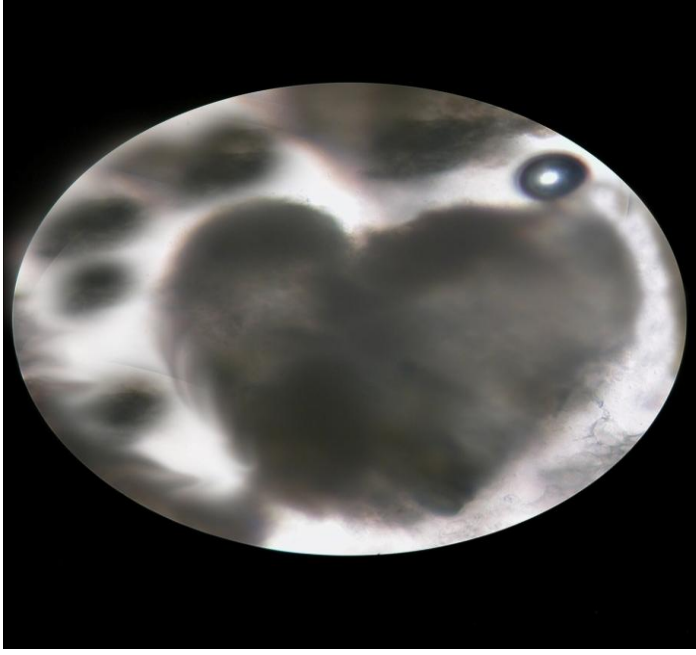


Şekil 4.16. c Globular şeklindeki embriyonik kümeler.

Globular şeklinde embriyogenik hücreler olgunlaşarak kalp şeklindeki embriyogenik hücelere dönüşmüştür (Şekil 4.17 a ve b).

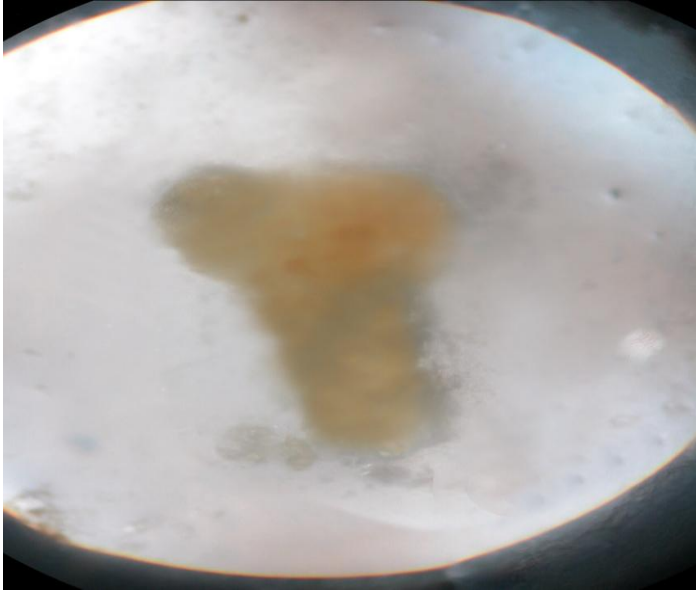


Şekil 4.17. a Kalp şeklindeki embriyonik yapı.



Şekil 4.17. b Kalp şeklindeki embriyonik yapı.

Kalp şeklindeki embriyogenik hücreler olgunlaşarak torpido şeklindeki embriyogenik hücreleri oluşturmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. a Torpido şeklindeki embriyonik yapı.



Şekil 4.18. b Torpido şeklindeki embriyonik yapı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada hazır besin ortamı olarak MS, B5 ve SH ortamları aynı BDM, eksplant ve ortam şartlarında denenmiştir. Embriyogenik kallus üretiminde hemen hemen ortak bir ortam olarak tescillenen MS ortamı en verimli ortam olarak saptanmıştır. MS ortamında kullanılan BDM çeşidinin etkisi ile kallus ilk önce kesilen uçlarda oluşmaya başlamıştır. Bu kesilen uçta oluşan yarayı tamir etme reaksiyonu, veya ortamdaki besin maddelerinin doku içine girerek dokunun fizyolojik karakterini değiştirmesi ve hücre bölünmesini hızlandırması sonucu olabilir (Ross ve Thrope, 1973).

Kullanılan BDM oluşan kallusun tipini belirler. Bu kallus organ üreten bir kallus olabilir, yani organogenik kallus üretebilir veya bu kallus embriyogenik ve non-embriyogenik de olabilir. Kallusun çeşidi mikroskop altında yapılan incelemelerde tespit edilmiştir. Embriyogenik kallus yuvarlak ve tek tip, bol sitoplazmalı, küçük vakuollü hücrelerden oluşmaktadır. Bu farklılaşmamış tek tip aktif hücreler ilkel embriyo taslağını oluşturur. Daha sonra bu yapı, küresel, kalpsi, torpils embriyo ve olgun embriyoya dönüşür (West ve Harada, 1993). Bir süre kallusların geliştiği ortam içeriği ile muamale edildikten sonra, sürekli bölünmeyi farklılaşmaya yönlendirmek için oksin ortamdan uzaklaştırılarak embriyo gelişimi başlatılmıştır.

İlk uygulamalarda Beyaz Hıyarın farklı eksplantlarının embriyogenik kallus üretme kapasitesi araştırılmıştır. Kalluslar mikroskop altında incelenerek hipokotil eksplantlarının kallus örneklerinde embriyogenik kallus yapıları gözlenmiş ve daha sonraki ortam ve BDM uygulamaları bu eksplant üzerinde yürütülmüştür. Embriyo ve embriyogenik kallus üretme yeterliliği genotipe bağlı olduğu gibi eksplanta da bağlıdır. Embriyogenik kallus elde etmek için kullanılan eksplantlar genellikle meristematik bölgeler olmakla beraber, türlere bağlı olarak her eksplantta olumlu sonuçlar rapor edilmiştir. Genellikle zigotik embriyo eldesi için kotiledon ve nodların daha uygun olduğu, bunun bir nedeninin olgun zigotik embriyonun endojen hormon miktarının yüksek olduğundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Vasil, 1987).

Sürgün gelişimi için en iyi sonucu 1mg/l BAP ile desteklenmiş ortam verirken; 1mg/l konsantrasyonlardaki NAA, 2,4-D, IAA B5 ve SH ortamlarında başarılı

olmamıştır. Yine 1mg/l BAP'lı SH ortamı %71, 1mg/l BAP'lı B5 ortamı %67 oranında başarılı olmuştur. Tüm bu başarılı üç sürgün gelişimi hipokotil eksplantında gözlenmiştir (Çizelge 4.1). BAP sentetik bir sitokinin olup sitokininlerin gövde uzaması üzerindeki etkileri bilinmektedir (Taiz ve Zaiger 2010). Kök gelişimi için en iyi sonucu 1mg/l IAA desteklenmiş ortam verirken NAA, 2,4-D, ve BAP MS, B5 ve SH ortamlarında başarılı sonuçlar ortaya koymamıştır. Kök gelişimi 1mg/l IAA'lı B5 ortamında yaprakta %66 ve hipokotilde %88 SH ortamında ise 1mg/l IAA içinde hipokotilde %88, yaprak sapında %71 ve yaprakta ise %64 ve MS ortamında ise 1mg/l IAA içinde hipokotilde %100, yaprak sapında %76 ve yaprakta ise %70 oranında başarı elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Kallus gelişimi SH ortamında 1mg/l BAP'lı hipokotil eksplantında %73 oranında, B5 ortamında 1mg/l BAP içinde hipokotilde %80 oranında 1mg/l NAA'de ise hipokotilde %77 kallus gelişimi verirken MS ortamında 1mg/l BAP ve NAA'de hipokotilde %100 oranında kallus gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Genel anlamda çizelge 4.1'e bakıldığında sürgün gelişimine ortam çeşidinden çok BDM'lerin etkili olduğu söylenebilir. Ortam kombinasyonlarında makro ve mikro elementler ve ortamı destekleyen diğer besin maddelerinin içerikleri yaklaşık aynı olmakla beraber konsantrasyonlar farklılık arz etmektedir (Babaoğlu ve ark. 2001). Eksplantları sürgün, kök ve kallus üretmeye zorlayan besin ortamlarının içeriklerinden çok BDM ve konsantrasyonlarıdır. Burada akla ilk gelen BDM'lerinin gen kontrolü üzerindeki etkisidir. Çünkü aynı eksplanttan aynı ortamda kullanılan BDM ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklı dokuların üretilmesi BDM'lerin DNA üzerinde farklılaşmayı kontrol eden genleri, konsantrasyona bağlı olarak aktive etmesi veya baskılaması ile ilgilidir. Ayrıca yine aynı BDM'ler konsantrasyona bağlı olarak birbirine zıt etkiler gösterebilmektedir. Bu da genom üzerindeki doku oluşumunu baskılayacak veya aktive edecek farklı genler yanında farklılaşmaya etki edecek değişik sentez yollarında, ilgili kimyasal bileşiklerin sentezini veya BDM'ler arasında büyümeyi baskılayan ABA veya etilen gibi hormonlarla antagonistik etki ile açıklanabilir (Kadıoğlu, 2004).

Oksinler, birçok bitkide embriyogenik kallus üretimi için temel bir BDM'dir. Bu çalışmada oksin türevlerinden 2,4-D, IAA ve NAA, sitokinin türevlerinden ise BAP çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonlarda kullanılmıştır. Birçok çalışmada oksin ve sitokinin kombinasyonları olumlu sonuçlar vermekle beraber, bu çalışmada hipokotil

eksplantında BAP yalnız başına veya oksinlerle birlikte kullanıldığında sürgün gelişimini teşvik ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar Cacho ve ark., (1991) çalışmaları ile sürgün gelişimi noktasında tam uyum, embriyogenik kallus üretme bakımından ise tam bir tezatlık göstermiştir. Sitokininler tek başına uygulandığında embriyogenik kallus üretimini baskılamakta (Kamada ve Harada, 1979), fakat birçok türde de embriyogenik kültürleri teşvik ettiği bilinmektedir (Evans ve ark. 1981). 2,4-D ve NAA hem yalnız uygulandığında hem de kombine uygulamalarda embriyogenik kallus üretimini teşvik ettikleri gözlenmekle beraber, NAA'nın daha verimli olduğu gözlenmiştir. Literatürde yaklaşık olarak embriyogenik kallus üretiminin ekseriyetenin 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarında elde edildiği rapor edilmesine (Baker ve Wetzstein, 1994) karşın Beyaz Hıyarda NAA 1.0-2.0 mg/l ve BAP 1.0-2.0 mg/l konsantrasyonlarda daha etkili olduğu saptanmıştır.

Selveraj ve ark., (2007), hıyar bitkisinde organogenezini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada 5 günlük kotiledon eksplantlarında yaklaşık %86.2 oranında başarılı olmuşlardır. Yapılan çalışmaların çoğunda elde edilen başarılı sonuçlar kotiledon eksplantlarında gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada yine salatık bitkisinde *in vitro* ortamda organogenez oluşumu incelenmiştir. *In vitro* ortamında *Cucumis sativus* L. Poinsett 76 bitkisinde hipokotil eksplantından organogenez sağlanmıştır. Bizim çalışmamızda Selveraj ve ark. 2006 ve 2007'de yaptıkları çalışmaya uygun sonuçlar vermiştir. Yapılan çalışmada kotiledondan az verim alınırken en verimli eksplantın hipokotil olduğu tespit edilmiştir. Aynı bitki türünden alınan eksplantlar organogenesis oluşturma kapasitesi bakımından büyük farklılıklar gösterebilirler (Gürel, ve Türker, 2001). Somatik embriyogenesis bitki doku kültürü çalışmalarında adventif sürgün rejenerasyonu yanı sıra yapay tohum üretimi için de önemlidir. Rejenerasyonun büyük oranda genotipe bağlı olduğu (Sorenses ve ark., 1989) bilinmekle birlikte, kullanılan protokoller ve eksplant seçimi embriyo oluşumunda etkili olmaktadır.

Çalışmalarımızda en başarılı olan BDM'nin, NAA ve BAP olduğu gözlenmiştir. Ferraria ve ark., (2005)'nin bildirdiğine göre, kallus taze ağırlığının NAA içeren ortamlarda daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışmalarımızda en yüksek miktarda kallus üretimini sağlayan BDM'nin NAA ve BAP olduğu açık bir şekilde görülmüştür.

Werbrouck ve Debergh (1994)'in bildirdiğine göre, sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök

oluşumunu, oksin ve sitokinin oranının eşit olması kallus oluşumunu desteklemektedir. Birçok raporda da artan sitokinin konsantrasyonu ile sürgün oluşturma oranının arttığı bildirilmektedir (Sagawa ve Kunisaki, 1990; Anderson ve ark., 1982; Simpson ve Bell, 1989; Kris ve ark., 2005; Eric, 2005; Al-Bahrany, 2002; Saadat ve Hennerty, 2002). Çalışmalarımızda sitokinin/oksin oranının yüksek olduğu uygulamalarda sürgün olduğu, oksin/sitokinin oranının yüksek olduğu uygulamalarda da kök olduğu gözlenmiştir. Bu durumda çalışmalarımızın Werboruck ve Debergh (1994), Sagawa ve Kunisaki (1990), Anderson ve ark., (1982), Simpson ve Bell (1989), Kris ve ark., (2005), Eric (2005), Al-Bahrany (2002), Saadat ve Hennerty (2002)'in bildirimleri ile uyumlu olduğu söylenebilir. Ancak oksin ve sitokinin oranının eşit olduğu uygulamalarda kallus üretimi bazı örneklerde çok az olmasına rağmen büyük çoğunluğunda hiç kallus üretilmediği gözlenmiştir. Bu sonuç genotipe bağlanmakla beraber çevrenin fiziksel şartları, dokunun bitkiden ayrıldığı sırada sahip olduğu endojen hormon konsantrasyonu ve hormon interaksiyonuna bağlanabilir.

Finer (1995)'in bildirdiğine göre, kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyogenik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine ihtiyaç duyulmaktadır. Oksin içeren besin ortamlarında embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler oksin içermeyen ortamlara aktarılmalıdır. Tisserat (1991)'ın bildirdiğine göre, eksplant yüksek oksin içeren besin ortamında kültüre alındığı zaman önce embriyogenik kallus oluşumu daha sonra da bu kallus üzerinde pro-embriyoların olduğu gözlenir. Bu kallus, oksin içermeyen besin ortamına transfer edildiği zaman da pro-embriyolardan bipolar embriyolar oluşur ve şartlar uygun ise bu embriyolardan fideler elde edilir. Çalışmalarımızda Finer (1995)'in bildirimleri dikkate alınarak eksplantlar önce oksin modifiyeli besin ortamlarında kültüre alındılar, daha sonra da oksin içermeyen ortamlara transfer edilerek embriyo oluşumu teşvik edilmeye çalışılmış ancak embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Ancak sitokinin türevli BAP'da embriyogenik hücreler oluşmuştur. Buda Finer (1995) ve Tisserat (1991)'in bildirimleriyle zıtlık göstermektedir.

Sonuç olarak; Somatik embriyogenez ve organogenez oluşumunda genotip yanında eksplant kaynağı, kullanılan bitki büyüme düzenleyiciler ve besin ortamları gibi birçok faktör etkili olmaktadır. Bu çalışmada da eksplant kaynağının ve uygulanan BDM'nin Beyaz Hıyar bitkisinde somatik embriyogenez ve organogenez oluşumuna

etkisi belirlenmiştir. Ancak Beyaz Türk Hıyarı olarak literatüre giren ve ekimi gün geçtikçe azalan ve nesli tükenmekle yüz yüze kalan bu bitkinin *in vitro* koşullarda tüm doku kültürü yöntemleri ile üretilebilmesi için daha etkin protokollere ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutabilecek bir niteliktedir. Elde edilen bu sonuçlar rejenerasyon yeteneği düşük olan diğer çeşitlere de uygulanabileceği gibi sentetik tohum üretimi çalışmalarında da kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abriea.L., Staden Van J., 2001. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars, ***Plant Growth Regulation***, 35(3): 263-267.
- Abak, K., Dumas De Vaulx, R. 1980. *In vitro* callus and shoot induction from hypocotyl and peduncle of musk melon (*Cucumis melo*). ***Cucurbit Genetic Cooperative Rep.*** 3:27-28.
- Al-Bahrany, A.M., 2002. Effect of Phytohormones on *in vitro* Shoot Multiplication and Rooting of Lime *Citrus aurantifolia* Swing. ***Scientia Horticulturae***, 95(4):285-. 295.
- Ammirato, P.V., 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures. ***Suspension Culture Tehniques and Hormone Requirements***, 14(1): 68 – 74.
- Anderson, H.M., Abbott, A.J., Wiltshire, S., 1982. Micropropagation of Strawberry Plants *in vitro* – Effect of Growth Regulators on Incidence of Multi-Apex Abnormality. ***Sci. Hort.***, 16: 331-341.
- Anonim, 2007. Hıyar yetiştiriciliği, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi. http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/modul_1er_pdf/Hıyar%20yetiştiriciliği.pdf Milli Eğitim Bakanlığı Ankara. erişim tarihi: 15.03.2013
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001. “***Bitki Biyoteknolojisi Doku kültürü ve uygulamaları 1.cilt***”, Selçuk Üniversitesi Yayınları., Konya. 14-15-40-71-72-219-374.
- Babaoğlu, M., 1998. ***Bitki Doku Kültürü ve Geleceği. Tarımda Yeni Ufuklar Sempozyumu***. Türk Ziraat Yüksek Müh. Bir. Vakfı, Ankara. 142-148,
- Baker C.H. ve Wetzstein H.Y. 1994. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon culture by continual exposure to 2,4-D. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 40: 249-254.
- Cacho M., Moran M., Herrera M.T., Fernandez T.J. Corchete M.P. 1991. Morphogenesis in leaf, hypocotyls, and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 25: 117-123.

- Carvalho C.H.S., Bohorovan N., Bordallo P.N., Abreu L.L., Valicente F.H., Bressan W., Paiva E., 1997. "Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes", ***Plant Cell Reports***, 17 (1): 73-76.
- Chang C., Chang W. C., 1998. "Cultures of meristems and calli" ***Plant Cell Reports***, 17-251-255.
- Chaudhry Z., Habib D., Rashid H., Qureshi A.S., 2004. "Regeneration from various explants of *in vitro* seedling of tomato (*Lycopersicon esculentum* c.v. Roma, L.)" ***Pakistan Journal of Biological Sciences***, 7 (2): 269-272.
- Chee Paula, P., 1991. "Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash cucurbita pepo L. cv. YC 60", ***Plant Cell Reports***, 9(11): 620-622.
- Collin H. A., Edwards H.S., 1998. "***Plant Cell Culture***", BIOS scientific Publisher. 158.
- Debeaujon I., Branchard M., 1993. "Somatic embryogenesis in cucurbitaceae", ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 34(1): 91-100.
- Er, C., Canpolat N., 1992. ***Bitki Islahında Doku Kültürleri***. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları, Ankara.
- Eric, B., 2005. Development of *in vitro* Methods For Ex Situ Conservation of Eucalyptus Impensa, An Endangered Mallee From Southwest Western Australia. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 83: 97- 102.
- Evans D., Sharp W., & Flick C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: ***Plant Tissue Cultures methods and Applications in Agriculture***. Thrope T.A. (Ed.). Academic Press, New York. pp. 45-113.
- Evans, D., Reed, S. M., 1981. Cytogenetic techniques. ***Plant Tissue Culture***. Thorpe Acad. Pres, New York. 213-240.
- Farooq M., Rashid H., Ihsanullah, Chaudhry Z., Marwat K.B., 2004. "Comparative tissue culture response of wheat cultivars and evaluation of regenerated plants" ***Pakistan Journal of Biological Sciences***, 7(3): 406-408.
- Ferraria, F., Pasquab, G., Monacellib, B., Ciminoc, P., Bottad, B., 2005. Xanthones From Calli of *Hypericum perforatum* Subsp. *Perforatum*. ***Natural Product Research***, 19: 171-176.

- Fras A., Maluszynska J., 2004. "The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*", **Genetic.** 121(2):145-54.
- Finer J.J., 1995. Direct somatic embriyogenesis. In; Gamborg OL, Philips GC (eds), **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**; Fundamental Methods, Springer, Berlin. 92-102.
- Gambley, R.L., Dodd, W.A., 1990. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant cell Tissue and Organ Culture**, 20:177-183.
- Gamborg, O. L., Shyluk, J. P., 1981. Nutrition media and charecteristics of plant cell and tissue cultures. **Plant Tissue Culture Acad. Pres**, 4(24): 19-25.
- Gonzalez J.M., Friero E., Jouven N., 2001. "Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* desf. cultivars", **Plant Breeding**, 120 (6): 513.
- Gönülşen, N., 1987. **Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları**. Ege Tarımsal Araş. Enst. Müd. Yay. No:78, İzmir.
- Gürel, E., Türker A. U., 2001. Organogenez. **Bitki Biyoteknolojisi 1.cilt**, Selçuk Üniversitesi Yayınları. Konya. 36-37.
- Gürel, E., 1997. Plant tissue culture techniques and types of *in vitro* developments occuring in cultures. **1. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongres**. Kırıkkale. 17-21.
- Han, J.S., Oh, D.G., Mok, I.G., Park, H. G. Vekim, C.K., 2004. Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). **Cell Biology and Morphogenesis**.
- Kadioğlu, A., 2004. **Bitki Fizyolojisi**. Trabzon. 258-257.
- Kamada H. & Harada H. 1979. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. 1. effect of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. **Z. P flenzen Physiol**. 91: 255-266.
- Khan Z. I., Hussain A., Sadiq M., 1999. "Optimization of different media for plant regeneration from callus culture of indica rice (*Oryza sativa*) genotype D.M. 25" **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2(3): 984-987.
- Kocaçalışkan İ., 2003. "**Bitki kültürleri (Organ, Doku ve Hücre)**" DPÜ Fen Edebiyat fakültesi Biyoloji Bölümü, Kütahya. 136.

- Kris, P., Tess, A., Jerzy, N., 2005. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking Cherry (*Prunus tomentosa*). ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***, 82: 207-211.
- Miller, T., Skoog, F., 1953. *In vitro* culture of higher plant. ***Am J. Botanic***, (40):768-73.
- Moreno, V., Garcia-Sogo, M., Granell, I., Garcia-Sogo, B., Roig, L.A. 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. 'AmerilloOro'). ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***, 5:139-146.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiology*, (25): 135 – 166.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, 84 (15): 473–497.
- Nitsch, N., 1968. *In vitro* culture of higher plants. ***Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.***, 12 (9): 1–92.
- Novak, F.J., Dolezelova, M., 1982. Hormone control of growth and differentiation in the *in vitro* cultured tissue of cucumber (*Cucumis sativus* L.). ***Biologia***, 37, 3. 283-289
- Paulet, F., 1965. *In vitro* culture of higher plants. ***Rev. Gen. Bot.***, (72): 697 – 792.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. ***Martinus Nighoff***, 139 – 154.
- Popelka J., Altpeter F., 2001. “Interactions between genotypes and culture media components for improved *in vitro* response of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines” ***Plant Cell Reports***, 20(7): 575-582
- Raharjo S.H.T., Punja ZK., 1993. Regeneration of plantlets from embryogenic suspension – cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. Cv Endeavor). ***In vitro Cellular And Developmental Biology-Plant***, 30(1); 16-20
- Rikiishi K., Matsuura T., Maekawa M., Nodak K., Takeda K., 2003. “Genetic analysis of tissue culture traits in barley cv. ‘Lenins’”, ***Plant Breeding***, 122(2): 99
- Ross M.K. & Thrope T.A. 1973. Physiological gradient and shoot initiation in tobacco callus cultures. ***Plant Cell Physiol***, 14: 473-480
- Saadat, Y.A., Hennerty, M.J., 2002. Factors Affecting The Shoot Multiplication of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). ***Scientia Horticulturae***, 95(3):251-260.

- Sanchez-Donaire, A., Guerra-Sanz, J.M., Encina, C.L., 2000. *In vitro* water melon genotype screening by adventitious shoot induction from and immature cotyledons. **Cucurbit Genetics Cooperative**, Rep. 23:49-50.
- Sagawa, Y., Kunisaki, J.T., 1990. Micropropagation of Floriculture Crops. In: Ammirato, P.V., Evans, D.R., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (Editors). **Hand Book of Plant Cell Culture Vol. 5, Ornamental Species**. McGraw Hill Publishing Company. 25-56.
- Selveraj N., Vasudevan A., Manickavasagam M., 2006. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. **Biologia Plantarum**, 50(1);123-126.
- Selveraj N., Vasudevan A., Manickavasagam A., Kasthuriengan S., Ganapathi A., 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. **Scientia Horticulture**, 112(1); 2-8.
- Sharp, W., Evans, D. A., Sondahl, M. R., 1983. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. **Plant Tissue Culture**, 35(53): 759 –762.
- Simpson, D.W., Bell, J.A., 1989. The Response of Different Genotypes of *Fragaria X Ananassa* and Their Seedling Progenies to *in vitro* Micropropagation and The Effect of Varying The Concentration of 6-Benzylaminopurine in The Proliferation Medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 17:225-234.
- Simpson, M.G., 2012. **Bitki Sistematigi-Plant Systematics** / çeviri editörü: Zeki AYTAÇ çeviri editör yardımcısı: Bahar KAPTANER İĞCİ, 2. Basımdan Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. LTD. ŞTİ, Yay. No:448, Ankara 341.
- Sorenses, E. L., H. Liu, Y. Wan and G. H. Liang., 1989. Registration of KS206 alfalfa germplasm with high *in vitro* regeneration of plants. **Crop Science**, 29 (6): 1576-1577.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2010. **Plant Physiology**, Sinauer Associates Inc Publisher, Sunderland Massachusetts, USA.
- Tisserat, B., 1991. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. In: (Editör: Dixon, R.A.) **Plant Cell Culture: A Practical Approach**. Oxford Uni. Press., New York, USA.
- Trulson, A.J., Shain, E.A., 1986. *In vitro* plant regeneration in the genus *Cucumis*. **Plant Science**, 47: 35–43.

- Urbanek A., Zechmann B. Muller M., 2005. "Plant regeneration via somatic embryogenesis in styrian pumpkin: Cytological and biochemical investigations", plant cell, ***Tissue and Organ Culture***, 79(3): 329-340.
- Usman M., Hussain Z., Fatima B., 2011. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced cucumber leaves. ***Pakistan Journal Of Botany***, 43(2); 1283-1293.
- Vasil I.K., 1987. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crop. J. ***Plant Physiol***, 128: 193-218.
- Wehner, T.C., Locy, R.D., 1981. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and Lines of *Cucumis sativus* L. ***Hort Science***, 16(6): 759-760.
- Werbrouck, S.P.O., Debergh P.C., 1994. Applied Aspects of Plant Regeneration (Micropropagation). In: (Editör: Dixon, R.A., Gonzales, R.A.) ***Plant Cell Culture: A Practical Approach***. Oxford Uni. Pres., New York, USA.
- West, M. ve Harada J.J., 1993. ***Embryogenesis in Higher Plants***: An Overview. Plant cell, 5(10): 1361-1369

ÖZ GEÇMİŞ

Burhan AVAŞ, 1985 yılında Şırnak'ta doğdu. 2003 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümüne başladı. 2009 yılında mezun oldu, 2011 yılın Şubat ayında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.