



**T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BAZI DOMATES GENOTİPLERİNDE KENDİLENMİŞ HATLARIN  
ELDE EDİLMESİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN KULLANILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan: Süleyman BOZMAZ  
Danışman: Doç.Dr. Naif GEBOLOĞLU**

**2007 - TOKAT**

**T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BAZI DOMATES GENOTİPLERİNDE KENDİLENMİŞ HATLARIN  
ELDE EDİLMESİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN KULLANILMASI**

**Süleyman BOZMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez, 15/08 /2007 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı İmza

Başkan :Doç.Dr. Naif GEBOLOĞLU

Üye :Doç.Dr. Ahmet YILDIRIM

Üye :Yrd.Doç.Dr. Ali ECE

ONAY:

Bu tez, ... / ... / 2007 tarih ve ..... sayılı Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyelerince kabul edilmiştir.

...../...../2007  
Enstitü Müdürü

**TEŞEKKÜR**

Bana bu konuda araştırma imkanı sağlayan ve çalışmalarım süresince beni her zaman destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Naif GEBOLOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan eşime ve tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

### BAZI DOMATES GENOTİPLERİNDE KENDİLENMİŞ HATLARIN ELDE EDİLMESİNDE EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN KULLANILMASI

**Süleyman BOZMAZ**

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**2007, 47 sayfa**

**Danışman : Doç.Dr. Naif GEBOLOĞLU**

**Jüri : Doç.Dr. Naif GEBOLOĞLU**

**Jüri :Doç.Dr. Ahmet YILDIRIM**

**Jüri :Yrd.Doç.Dr. Ali ECE**

Embriyo kültürü tekniği domates ıslahında önemli bir yere sahiptir. Domates ıslahında embriyo kültürünün uygulama alanlarından biri ıslah süresinin kısaltılmasıdır. Bu çalışmanın amacı domateste genotip, embriyo yaşı ve besin ortamının embriyo kültürünün başarısı ve kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Denemede Cemile Fı, Newton Fı, Sümela Fı, RS 400 Fı, Menhir Fı, Astona Fı, Alida Fı, Diyansa Fı ve bir lokal populasyon olmak üzere 9 domates genotipi kullanılmıştır. Temel besin ortamı olarak Murashige and Skoog (MS) besin ortamı kullanılmıştır. MS + 0,1 mg/l kinetin, MS + 0,1 mg/l IAA, MS + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 ml/IAA, MS + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP ve kontrol (MS) olmak üzere 5 farklı ortam ile 20-24-28-32 ve 36 günlük embriyolar denenmiştir.

Denemede MS + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP uygulamasında embriyolardan bitki elde edilememiştir. En yüksek embriyo gelişim oranı % 100 ile 28-36 günlük embriyolardan elde edilmiştir. En düşük başarı oranı ise 20 günlük embriyolarda % 55,22 olmuştur. Besin ortamları ve genotipler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Embryo gelişimindeki başarı üzerine stokininlerin ve oksinlerin etkisi olmamıştır. Olgunlaşmamış domates embriyolarının gelişmesinde MS besin ortamı yeterli olurken, denemede başarı oranı üzerine en etkili faktör embriyo yaşı çıkmıştır.

Denemede tozlaşmadan çiçeklenmeye kadar geçen süre 69,3-128,6 gün arasında değişirken, kontrol uygulamasında 118-132 gün arasında gerçekleşmiştir. Embriyo kültürü uygulaması kontrol uygulamalarına göre ıslah süresini 36,6-56,7 gün arasında kısaltmıştır. Besin ortamları ve genotipler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Denemede tozlaşmadan çiçeklenmeye kadar geçen sürenin kısaltılmasında en etkili faktör embriyo yaşı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Domates, embriyo kültürü, embriyo yaşı, besin ortamı, genotip

**ABSTRACT****THE USE OF EMBRYO CULTURE TO OBTAIN INBRED LINES in SOME TOMATO GENOTYPES****Süleyman BOZMAZ****Gaziosmanpaşa University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Horticulture****Master Thesis, 2007, 47 pages****Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Naif GEBOLOĞLU****Jury : Doç.Dr. Naif GEBOLOĞLU  
Jury :Doç.Dr. Ahmet YILDIRIM  
Jury :Yrd.Doç.Dr. Ali ECE**

Embryo culture has an important role in tomato breeding. One of the application of embryo culture is to shortening the breeding cycle in tomato. The main objective of this study is to investigate the effect of different embryo ages, nutrient mediums and genotypes on the success rate of embryo culture and duration from inbreeding to flowering of tomato. Nine tomato genotypes, Cemile F<sub>1</sub>, Newton F<sub>1</sub>, Sümela F<sub>1</sub>, RS 400 F<sub>1</sub>, Menhir F<sub>1</sub>, Astona F<sub>1</sub>, Alida F<sub>1</sub>, Diyansa F<sub>1</sub> and one local tomato population, were used in the study. Murashige and Skoog (MS), MS + 0,1 mg/l kinetin, MS + 0,1 mg/l IAA, MS + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 ml/IAA and MS + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP were used as nutrient media. In the study, immature tomato embryos, 20-24-28-32 and 36 days after pollination (DAP) were tested.

No plants were obtained from MS + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP medium. The highest embryo development ratio (% 100) was obtained from 28-36 DAP embryos. The lowest embryo development ratio was 55,22% in 20 DAP embryos. Differences among genotypes and nutrient medium were not statistically important. Cytocinin and auxin application was not effective on embryo development ratio. MS nutrient medium was enough for development of immature tomato embryos. In the study, the most effective factor on embryo development ratio was the embryo age.

In the study, days from pollination to flowering ranged between 69,3-128,6 days. Days from pollination to flowering were between 118-132 days in the control application. Embryo culture shortened the breeding cycle about 36,6-56,7 days in comparison to the control application. Differences among genotypes and nutrient media were not important. In the study, the most effective factor was embryo age in shortening the days from pollination to flowering.

**Key Words :** Tomato, embryo culture, embryo age, nutrient media, genotype

**İÇİNDEKİLER****Sayfa No**

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET.....                                                             | i   |
| ABSTRACT.....                                                         | ii  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                      | iii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                 | iv  |
| ÇİZELGELER LİSTESİ.....                                               | v   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....                                  | vi  |
| 1. GİRİŞ .....                                                        | 1   |
| 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....                                            | 4   |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                            | 14  |
| 3.1. Materyal.....                                                    | 14  |
| 3.2. Yöntem.....                                                      | 17  |
| 3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi Ve Kendilemelerin Yapılışı.....      | 17  |
| 3.2.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması.....                           | 19  |
| 3.2.3. Embriyoların Çıkartılması Ve Kültür Ortamına Aktarılması ..... | 20  |
| 3.2.4. Kültür Koşulları.....                                          | 22  |
| 3.2.5. Bitkilerin Tüplere Aktarılması Ve Dış Koşullara Adaptasyonu... | 25  |
| 3.2.6. Denemede Yapılan Gözlemler.....                                | 26  |
| 3.2.6.1. Embriyo Gelişiminde Başarı Oranlarının Belirlenmesi.....     | 26  |
| 3.2.6.2. Çiçeklenmeye Kadar Geçen Sürenin Belirlenmesi.....           | 26  |
| 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....                               | 27  |
| 4.1. Embriyo Kültürü Başarı Oranları.....                             | 28  |
| 4.2. Kendilemeden Çiçeklenmeye Kadar Geçen Süre.....                  | 34  |
| KAYNAKLAR.....                                                        | 41  |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

| <b><u>Şekil</u></b>                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 3.1. Denemede kullanılan laboratuvar malzemeleri.....                                | 16                  |
| 3.2. Kendileme sonrasında farklı dönemlerdeki meyvelerin görünüşü.....               | 18                  |
| 3.3. Besin ortamına aktarılmaya hazır farklı yaşlardaki embriyolar.....              | 20                  |
| 3.4. Embriyoların petrilere aktarılmış durumları.....                                | 21                  |
| 3.5. Embriyoların kültüre alındığı ortamın genel görünümü.....                       | 22                  |
| 3.6. Cam tüplere aktarılmış bitkilerin genel görünümü.....                           | 23                  |
| 3.7. Saksılara aktarılmaya hazır bitkiler.....                                       | 24                  |
| 3.8. Dış koşullara alıştırma dönemindeki bitkilerin genel görünümü.....              | 25                  |
| 4.1. NAA+BAP ortamında kallus oluşturmuş embriyoların genel görünüşü.....            | 27                  |
| 4.2. 10 nolu genotipe ait 28 günlük embriyoların ortamlara göre gelişme düzeyleri    | 33                  |
| 4.3. 09 nolu genotipe ait 32 günlük embriyoların farklı ortamlarda gelişme durumları | 34                  |
| 4.4. Çiçeklenme dönemine gelmiş bitkilerin genel görünümü.....                       | 39                  |
| 4.5. Çiçeklenme sonrası bitkilerde gelişme durumları.....                            | 39                  |
| 4.6. Çiçeklenme döneminde gözlem yapılan bitkiler.....                               | 40                  |

## ÇİZELGELER LİSTESİ

| <u>Çizelge</u>                                                                            | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.1. Denemede kullanılan genotipler.....                                                  | 14           |
| 3.2. Denemede kullanılan MS besin ortamının bileşimi.....                                 | 15           |
| 3.3. Denemede kullanılan büyüme düzenleyici maddeler.....                                 | 16           |
| 4.1. Genotiplere, embriyo yaşlarına ve ortamlara göre başarı oranları .....               | 30           |
| 4.2. Embriyo yaşı ve ortamlara göre başarı oranları.....                                  | 31           |
| 4.3. Genotiplere ve ortamlara göre başarı oranları.....                                   | 31           |
| 4.4. Genotiplere, embriyo yaşına ve ortamlara göre çiçeklenmeye kadar geçen süreler (gün) | 35           |
| 4.5. Embriyo yaşı ve ortamlara göre kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre (gün)....  | 36           |
| 4.6. Genotiplere ve ortamlara göre kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre (gün).....  | 36           |
| 4.7. Genotiplere ait kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süreler (gün) .....            | 37           |



**SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ**

|              |                                                                                      |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BA</b>    | Benzil Adenin                                                                        |
| <b>BAP</b>   | 6-Benzilaminopurin                                                                   |
| <b>IAA</b>   | İndol asetik asit                                                                    |
| <b>2,4-D</b> | 2,4-Dichlorophenoxyacetic asit                                                       |
| <b>NAA</b>   | Naftalin asetik asit                                                                 |
| <b>KIN</b>   | Kinetin                                                                              |
| <b>MS</b>    | Murashige, T., Skoog, F. (1962) tarafından geliştirilmiş besin ortamı                |
| <b>IBA</b>   | İndol Butrik Asit                                                                    |
| <b>ABA</b>   | Abcisik Asit                                                                         |
| <b>GA</b>    | Gibberellik Asit                                                                     |
| <b>B5</b>    | Gamborg, O.L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968) tarafından geliştirilmiş besin ortamı |
| <b>HLH</b>   | Neal, C.A.; Topoleski, L.D. (1983) tarafından geliştirilmiş besin ortamı             |

## 1. GİRİŞ

*Solanaceae* familyasının önemli türlerinden biri olan domates (*Lycopersicon esculentum* Mili.) dünya üzerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Kültüre alınışının yaklaşık 100 yıllık bir geçmişi olan domates, özellikle son 25 yıl içinde büyük bir popülerite kazanmıştır. Yetiştiriciliğinde çok farklı tekniklerin kullanıldığı domates dünya üzerinde 4,6 milyon hektar alanda 130 milyon ton dolayında üretilmektedir (Anonymous, 2005).

Domates doğal yetiştirme ortamında çok yıllık bir bitki olmasına karşın kültüre alınan çeşitleri tek yıllıktır. Tarla koşullarında bodur veya oturak çeşitlerinin yanı sıra sırk çeşitleri de yetiştirilmektedir. Örtü altı yetiştiriciliğinde ise sırk çeşitleri kullanılan domates taze, pişirilerek, kurutularak, dondurularak, konservesi yapılarak, salça, sos ve meyve suyu yapımında olmak üzere çok değişik şekillerde değerlendirilebilmektedir. Sahip olduğu besin değeri ve insan sağlığına olan olumlu etkileri nedeniyle domates günümüzün vazgeçilmez sebzelerinden biri olmuştur (Vural ve ark., 2000; Hobson and Davies, 1971; Rao and Agarwal, 2000).

Kültüre alınması ile birlikte domates üzerinde bilimsel çalışmalar da başlamıştır. Gen kaynaklarından alınan tiplerin içinden en iyilerinin seçilerek yetiştiricilikte kullanılmasıyla başlayan çalışmalar, bilim ve teknolojiye yeniliklerle beraber giderek daha da spesifik konular üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle son 20-30 yıllık dönemde biyoteknoloji alanındaki gelişmeler domates ile ilgili çalışmalarda da etkisini göstermiştir. Domatesteki çalışmalar genellikle verim ve kalitenin iyileştirilmesi, üretim maliyetinin düşürülmesi, biyotik ve abiyotik faktörlere karşı toleranslılık ve dayanıklılığın artırılması, insan sağlığını tehdit etmeyen ve çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi ve benzeri konular üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar içinde domates ıslahı ayrı bir yer tutmaktadır. Başlangıçta klasik ıslah yöntemleriyle başlayan çalışmalar daha sonra biyoteknolojik yöntemlerle entegre olmuş ve çok sayıda üstün özellikli F<sub>1</sub>

hibrit çeşitler geliştirilmiştir. Bu bağlamda domates ıslahında doku kültürü teknikleri önemli bir yere sahiptir (Minneo, 1990; Bhatia et al., 2004).

Bitkilerden alınan organ, doku, hücre veya hücre kısımlarının steril koşullarda yapay besin ortamlarında yetiştirilmesi, geliştirilmesi ve yeni bitkiye dönüştürülmesi olayına bitki doku kültürü adı verilmektedir. Doku kültürü çalışmalarında amaca bağlı olarak başlangıç materyalleri meristem, embriyo, anter, protoplast gibi değişik bitki aksamaları olabilmektedir. Doku kültürü yöntemleri domates ıslahında ticari değere sahip bitkilerin geliştirilmesinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu sayede yabancı ve kültür domateslerinden üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur (Evans, 1989; Zapata, 1980; Novak and Moskova, 1979; Bhatia et al, 2004).

Domateste doku kültürü çalışmaları biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı ve toleranslı genotiplerin geliştirilmesi, ıslahta önemli bir yeri olan haploid bitkilerin elde edilmesi, çoğaltma, somatik bitkilerin geliştirilmesi, ıslah süresinin kısaltılması ve domates ıslahında karşılaşılan engellerin ortadan kaldırılmasında etkili olan zigotik embriyogenesis konularında yoğunlaşmıştır (Stavarek and Rains, 1984; Rahman and Kaul, 1989; Toyoda et al., 1989; Zagorska et al., 1998; Wijbrandi et al., 1990).

Domateste embriyo kültürü zigotik ve somatik embriyo kültürü olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Somatik embriyo kültüründe olgunlaşmış veya olgunlaşmamış embriyoların explantlarından yeni bitkiler elde edilmektedir. Somatik embriyo kültüründe zigotik embriyolar da kullanılabilir. Zigotik embriyo kültüründe ise olgunlaşmış veya olgunlaşmamış embriyolardan gelişmeleri devam ettirilerek tam bitkiler elde edilmektedir. Sunulan bu çalışmanın konusunu oluşturan domateste zigotik embriyo kültürünün amacı, olgunlaşmamış embriyoların endospermden ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarında gelişmelerinin tamamlanarak tam bitkilerin elde edilmesidir. Embriyo kültürü çoğunlukla ıslah çalışmalarında kullanılan bir tekniktir. Buna ilave olarak temel biyolojik çalışmalarda, tohumların çimlenememesi durumunda, ıslah süresinin kısaltılmasında, yaşayamayan veya gelişmesini devam ettiremeyen embriyoların kurtarılmasında ve haploid bitkilerin elde edilmesinde embriyo kültürü tekniğinden yararlanılmaktadır (Gönülşen, 1987; Bürün ve Gürel, 2001; Monnier, 1990; Kahsa and Kao, 1970; Raghavan, 2003).

Domates ıslahında karşılaşılan önemli zorluklardan biri ıslah süresinin uzun olmasıdır. Homozigot kendilenmiş hatların veya geri melez hatların elde edilmesi için amaca ve bitkisel materyalin özelliğine bağlı olarak 4-6 generasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Her kendilemede veya geriye melezlemede tohum elde edilinceye kadar geçen sürenin uzun olması nedeniyle ekolojiye ve ıslah çalışmasının yürütüldüğü şartlara bağlı olarak yılda maksimum 2 veya 3 generasyon ilerlenebilmektedir. Kendilemelerden belirli bir süre sonra tohum taslaklarından olgunlaşmamış embriyoların alınarak *in vitro* koşullarda gelişmelerinin devam ettirilmesi kendilemeden tohum elde edilinceye kadar geçen sürenin kısalmasında etkili olabilmektedir (Ellialtıoğlu ve Abak, 1986). Olgunlaşmamış embriyoların endospermden alınma zamanının iyi belirlenmesi ve uygun besin ortamı seçimi embriyo kültüründe başarı oranı üzerine etkili olmaktadır.

Sunulan bu çalışmada, farklı domates genotiplerinin olgunlaşmamış embriyolarının endospermden ayrılarak değişik besin ortamlarında olgunlaşmalarının sağlanması amaçlanmıştır. Bu maksatla 10 domates genotipi kendilenmiş ve kendilemelerden 20, 24, 28, 32 ve 36 gün sonra tohum taslaklarından embriyolar alınarak MS temel besin ortamına 4 değişik büyüme düzenleyicinin ilave edildiği kültür ortamlarında gelişmeleri takip edilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Bitkilerde döllenmeden sonra olgunlaşmış veya olgunlaşmamış embriyoların endospermden ayrılarak steril şartlarda *in vitro* ortamda yaşama yeteneğine sahip bitkiye dönüştürülmesine embriyo kültürü denilmektedir (Pierik, 1989). Embriyo kültürünün bitkilerde ilk uygulaması Hanning tarafından başlatılmıştır. Araştırmacı 1904 yılında *Cruciferae* familyasından iki farklı cinse ait bitkilerin embriyolarının *in vitro* koşullarında yaşamalarını sağlamıştır. Daha sonra 1924 yılında Dietrich farklı türlerde dormansi dönemindeki tohumlardan aldığı embriyoların *in vitro* koşullarda gelişmelerini devam ettirerek dormansiyi kırmayı başarmıştır. 1925-1929 yıllarında ise Laibach gelişmelerini devam ettiremeyen melez embriyoların *in vitro* koşullarda gelişmelerini sağlamıştır. Embriyo kültürü 1945 yılından itibaren özellikle ıslahçılar tarafından türler arası melezlemeler başta olmak üzere bir çok alanda başarıyla uygulanmaktadır (Pierik, 1989; Hatipoğlu, 2002).

Genelde embriyo kültürünün iki tipi vardır. Bunlardan biri olgunlaşmış tohumlardan izole edilen embriyoların kültüre alınması olup, bu yöntem daha çok olgunlaşmış tohumlarda çimlenmeyi engelleyici faktörlerin elemine edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemin uygulanması son derece kolaydır ve agar, şeker ile minerallerden oluşan basit besin ortamlarında yüksek başarı oranlarıyla uygulanan bir tekniktir. İkinci yöntem ise olgunlaşmamış tohumlardan alınan olgunlaşmamış embriyoların kültürü olup, zor ve kompleks besin ortamları gerektiren bir tekniktir (Pierik, 1989).

Embriyo kültürü bitki ıslahı çalışmalarında çok yönlü bir kullanım alanına sahiptir. Embriyo kültürünün uygulama alanlarından biri temel biyolojik çalışmalardır. Bu bağlamda embriyogenesis çalışmak için embriyo kültürü iyi bir olanaktır. Bu sayede embriyogenesisteki farklı gelişme dönemleri analiz edilebilmektedir. Bitkiden embriyolar izole edilmekte ve böylece zigot döneminden başlayarak tohumun olgunlaşmasına kadar geçen tüm evreler incelenebilmektedir. Embriyo kültürü sayesinde embriyonal büyüme

ihtiyaçlarının belirlenmesi mümkün olmuştur. Böylece zigotik embriyoların büyüme istekleri, büyüme koşulları ve fitohormonların etkisi ortaya konmaktadır (Raghavan, 2003).

Uysal ve ark. (2007), embriyo kültürünün bitkilerde farklı amaçlarla kullanılan bir teknik olduğunu, tohum dışında embriyo gelişiminin incelenmesi, yaşama yeteneğine sahip olmayan embriyoların kurtarılması ve haploid bitki geliştirmek için kullanıldığını belirtmektedirler. Araştırmacılar bu tekniğin özellikle genetik tabanı daralmış, tür içindeki varyasyonun azalmış olduğu durumlarda mevcut gen havuzunun genişletilmesi ve arzu edilen çeşitlere istenen özelliklerin aktarılmasında klasik ışlah metotlarıyla başarı sağlanamadığı durumlarda başarı oranının artması ve ışlah süresinin kısaltılmasında başarıyla uygulandığını vurgulamaktadırlar. Ayrıca embriyo kültürü tekniğinin embriyonal büyüme ve farklılaşma üzerine besinlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve diğer kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkilerinin incelenmesine de olanak sağladığı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir.

Embriyo kültürünün diğer bir kullanım alanı dormansi halindeki tohumların embriyolarının endosperminden alınarak gelişmelerini devam ettirmelerinin sağlanmasıdır. Böylece endosperminden, tohum kabuğunun geçirimsiz olmasından veya tohum içindeki çimlenmeyi engelleyen endogenous kimyasallardan kaynaklanan dormansi nedeniyle imlenemeyen embriyolar *in vitro* ortamda kolayca imlenebilmektedir (Biggs et al., 1986; Ho, 1987; Sharma et al., 1996).

Bazı bitki türlerinde meyvelerin hızlı olgunlaşmasına bağlı olarak tohumun ve embriyonun gelişememesi nedeniyle embriyoların canlılıkları azalmakta veya tamamen kaybolmaktadır. Örneğin *Vitis* türlerinin erken olgunlaşan çeşitlerinde zayıf embriyo gelişmesinden dolayı çimlenme oranları da az olmaktadır. Embriyo gelişmesinin zayıf olduğu veya embriyo aborsiyonlarının gözlendiği durumlarda embriyo kültürü yapılarak elde edilen bitkilerin dişi birey olarak kullanılmasına olanak sağlanabilmektedir (Emershad and Ramming, 1984). Ayrıca uzak akraba olan türler arası melezlemelerde de döllenme olmasına karşın hibrit embriyolar yaşayamamaktadırlar. Bu tip embriyolar canlılıklarını kaybetmeden önce yapay besin ortamlarına alındıklarında gelişmelerini devam ettirebilmektedirler. Embriyo kültürü, embriyo kurtarma olarak bilinen bu alanda

özellikle de türler arası melezlemelerde başarıyla uygulanmaktadır (Monnier, 1990; Hossain et al., 2003; Bhatia et al, 2004; Hogenboom, 1972).

Sharma et al. (1996), bitki ıslahçılarının genellikle kalıtsallığı zayıf, olgunlaşmayan veya dejenere olan hibrit embriyoları kurtarmak için embriyo kültürü yöntemini kullandıklarını ve kültüre alınan embriyolardan bitkilerin başarıyla elde edilmesinin olgunluk safhasına ve besin ortamının içeriğine bağlı olduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılara göre gelişmenin herhangi bir safhasında embriyoların aborsiyonu hibridizasyonun yapıldığı türler arasındaki uzaklığa bağlı olarak değişmektedir. Türler arası melezlerde ilk embriyo kültürü tekniğinin Laibach (1925, 1929) tarafından *Linum perenne* x *L. austriacum* melezinde başarıyla uygulandığını belirten araştırmacılar, embriyo kültürü veya embriyo kurtarma tekniğinin bu zamandan beri birçok uyumsuz melezde yaygın olarak uygulanan bir teknik olduğunu vurgulamaktadırlar. Araştırmacılara göre embriyo kültürü ayrıca haploid bitkilerin gelişmesinde zorluklar yaşanan embriyolarının kurtarılmasında ve ıslah süresinin kısaltılmasında da başarıyla uygulanmaktadır.

Domateste embriyo kültürünün kullanım alanlarını araştıran Demirel ve Şeniz (1997), *Lycopersicon esculentum*'a ait 3 çeşit ile *L. pimpinellifolium* ve *L. peruvianum* türleri arasında resiprokal melezlemeler yapmışlardır. *L. pimpinellifolium*'un ana ve baba ebeveyn olarak kullanıldığı melez kombinasyonlarından alınan 24 günlük embriyolar 2 farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. Araştırmacılar denemede kullanılan ebeveynlerin ana yada baba ebeveyn olması, besin ortamı ve bu iki faktörün interaksiyonlarının kültüre alınan embriyoların gelişmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. *L. peruvianum*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemelerden tohum elde edemeyen araştırmacılar, 40 günlük embriyoları kültür ortamına aldıklarında da başarı elde edememişlerdir. Diğer taraftan *L. esculentum* x *L. peruvianum* melezlerinde embriyo kültüründe başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Aragao et al. (2002), domateste türler arası melezlemede embriyo kurtarma tekniği üzerine yaptıkları çalışmada *Lycopersicon esculentum* x *L. Peruvianum*'u melezlemişlerdir. Denemede 3 farklı besin ortamını kullanan araştırmacılar en iyi sonucu HLH (Neal and Topoleski, 1983) besin ortamından elde etmişlerdir. Melezlemeden 25-

30-35-40 ve 45 gün sonra aldıkları embriyolardan en iyi sonucu 30 günlük embriyolardan elde eden araştırmacılar embriyo kurtarmada kültüre alınacak embriyolarda ideal yaşı 26-35 gün arasında olması gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Young et al. (1987), *Lycopersicon peruvianum* ve *L. esculentum* embriyolarından *in vitro* koşullarda klonal çoğaltmayı denedikleri çalışmalarında HLH temel besin ortamına 1 g/litre bira mayası + 2 mg/litre BAP ilave edilmiş ortamda olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyolar ve sürgünler elde etmişlerdir. Başarı oranının embriyoların yaşına bağlı olarak değiştiğini ifade eden araştırmacılar *Lycopersicon* cinsine ait türlerde embriyo kültürü kullanılarak embriyolardan sürgünlerin elde edilmesinin mümkün olduğunu belirtmektedirler.

*Lycopersicon esculentum* ve *L. peruvianum* türleri arasında yapılan melezleme çalışmalarında embriyo explantlarında kallus kültürünün etkisini araştıran Thomas ve Prat (1981), bu iki türe ait VFNT cherry x LA1283-4 melezinden canlı tohumların elde edilemediğini ancak embriyo kallus yönteminin % 12 başarı sağladığını, kallus klonlarından rejenerasyonunu devam ettiren ve köklenen bitki sayısının ise % 90 olduğunu belirtmektedirler.

Beharav and Cohen (1995), *Cucumis melo* ile *Cucumis metuliferus* türleri arasında yaptıkları melezlemede embriyo kurtarma tekniğini kullanarak melez bitkiler elde etmeyi amaçlamışlardır. Kinetin ve GA<sub>3</sub>'ün farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı denemede en iyi sonucun 17 günlük embriyoların 0,5 mg/litre kinetin takviyeli ortamdan alındığını belirten araştırmacılar embriyo kurtarma tekniği sayesinde melez bitkiler elde etmeyi başarmışlardır.

Fasulyede *Pseudomonas phaseolicola*, *Xantomonas phaseoli* ve *Fusarium solani*'ye karşı dayanıklılık geliştirmek için *Phaseolus phaseolica* bitkiler söz konusu hastalıklara karşı dayanıklılık geni taşıyan *P. acutifollius* ile melezlenmiştir. Türler arası melez uyuşmazlığı görülen bu melezlemede embriyo kültürü uygulanarak embriyolar kurtarılmış ve uyuşmaz bir melez çalışmasından hibrit bitkiler elde edilmiştir. Benzer bir çalışma *Vigna radiata*'da sarı mozaik virüsüne ve baklada çatlamaya karşı yürütülmüş ve *V. radiata* ile *V. mungo* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Türler arası



melez uyumsuzluğunun görüldüğü bu çalışmada genç melez embriyoların embriyo kültürüne daha uyumlu olduğu belirlenmiştir. (Bajaj et al., 1982; Bajaj, 1990).

Embriyo kültürünün bitki ıslahında başarıyla uygulandığı başka bir alan ise ıslah süresinin kısaltılmasıdır. Kendileme ve melezleme çalışmalarında döllenmeyi takip eden dönemde embriyolar olgunlaşmadan endospermden ayrılarak besin ortamına alınmakta ve gelişmelerini *in vitro* şartlarda devam ettirmektedirler. Bu yöntem türe ve amaca göre değişmekle beraber ıslah çalışmalarında tohumdan tohuma kadar geçen sürenin kısaltılmasında etkili olmaktadır (Ellialtıoğlu ve Abak, 1986; Cravero and Cointy, 2007).

Domateste genotip ve explant tipinin sürgün regenerasyonu üzerine etkisini araştıran Gubis et al. (2003), 13 domates çeşidinde 6 farklı explant tiplerini MS besin ortamında kültüre almışlardır. MS besin ortamını 1 mg/litre zeatin, ve 0.1 mg/litre IAA ile zenginleştiren araştırmacılar explantların rejenerasyonunda en yüksek başarı oranını hipokotil'den elde etmişlerdir. Araştırmacılara göre başarı oranının genotipe göre değişmediği çalışmada ve bu oran 1 çeşitte % 86, diğer çeşitlerde % 100 olmuştur.

Plana et al. (2006), domateste *in vitro* rejenerasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada domates tohumlarının olgun embriyolarından aldıkları kotiledonları 2 mg/litre zeatin veya 2 mg/litre BAP ile zenginleştirilmiş MS besin ortamı içinde kültüre almışlardır. Ortam pH'sını 5,5 olarak düzenleyen araştırmacılar sürgün oluşumunda % 100 başarı elde ederken bir explanttan 2.8l'e kadar sürgün elde etmişlerdir.

Biberde zigotik embriyo hipokotillerinde bitki regenerasyonu üzerinde çalışan Arous et al. (2001), oksin olarak 0.5 - 0.2 mg/litre arasında değişen miktarlarda 2,4-D, IAA ve NAA; sitokinin olarak 1 - 6 mg/litre arasında değişen oranlarda BAP ve kinetin kullanmışlardır. Denemede MS besin ortamı kullanılmış ve ortam pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Embriyolardan sürgün oluşumu sadece BAP ilave edilmiş MS ortamından elde edilirken, NAA + BAP kombinasyonu başarı oranını arttırmıştır. Çalışmada 2,4-D + BAP kombinasyonu kallus oluşumunu teşvik ederken tomurcuk oluşumunu olumsuz yönde etkilemiştir. Denemede zigotik embriyolardan sürgün oluşumu bakımından en yüksek başarı oranı % 77,4 ile 1 mg/litre NAA + 5 mg/litre BAP kombinasyonundan elde edilmiştir. Araştırmacılar kültür ortamında elde ettikleri genç

bitkileri seraya aktardıklarında bitkilerin canlılıklarını devam ettirme oranı % 100 olmuştur.

Biberde doku kültürü yöntemleri üzerinde çalışan Agrawal et al. (1989), embriyo kültüründe besin ortamı olarak MS kullanmışlardır. Besin ortamı içine farklı oranlarda BAP, kinetin, IAA, IBA, NAA ve 2,4-D ilave eden araştırmacılar 5 mg/litre BAP içeren besin ortamında sürgün oluşumunun en fazla olduğunu ancak sürgünlerin gelişmediğini belirtmektedirler. Embriyo kültüründe gelişmiş bitkiler elde etmede en uygun ortamın MS + 0.1 mg/litre IBA veya NAA kombinasyonundan oluşan ortam olduğu ifade edilmektedir.

Lazzeri et al. (1987), soya fasulyesinde değişik hormonların ve bunların kombinasyonlarının somatik embriyogenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar olgunlaşmamış embriyolardan izole ettikleri kotiledonları NAA, 2,4-D, BAP ve ABA ile desteklenmiş MS besin ortamında kültüre almışlardır. Somatik embriyo morfolojisinin oksin tipine göre değiştiği çalışmada en iyi sonucun 2,4-D uygulanan muamelelerden elde edildiği bulunmuştur.

Fasulyede *in vitro* rejenerasyon üzerine yapılan araştırmaları özetleyen Veltcheva et al. (2005), fasulyede farklı aksamalardan alınan explantlardan *in vitro* regenerasyonunun uygulamalara bağlı olarak düşük veya yüksek başarı düzeyinde uygulanabildiğini, embriyo kültürünün ağırlıklı olarak embriyo kurtarma çalışmalarında tercih edildiğini ve *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında 2,4-D, NAA, GA<sub>3</sub> ve BA'nın başarılı sonuçlar ortaya koyduğunu belirtmektedirler.

Mukherjee et al. (1991), tatlı patatesten olgunlaşmamış embriyolarla yürüttükleri çalışmada 6 ile 12 günlük embriyoları NAA, BA, ve GA takviyeli MS besin ortamında kültüre almışlardır. Araştırmacılar denemede en iyi bitki gelişiminin MS + 1 µM NAA + 2 µM BA + 0.5 µM GA uygulamasından elde edildiğini bulmuşlardır.

Cumin (*Cuminum cyrinurny*)'da embriyo explantlarının rejenerasyonu üzerinde çalışan Ebrahimie et al. (2003), *Umbelliferae* familyasına ait bitkilerde çeşitli biyotik stres faktörlerinin yetiştiriciliği sınırladığını belirtmektedirler. Araştırmacılar farklı embriyo explantlarını MS ve B5 ortamlarında denemişlerdir. Ortamlara değişik makro ve

mikro elementler, vitaminler ve şeker ilave eden araştırmacılar büyüme düzenleyici olarak farklı konsantrasyonlarda NAA, IAA, BAP ve bunların değişik kombinasyonlarını denemişlerdir. Embriyo eksplantlarından elde edilen sürgün sayısını ve kallus oluşumunu inceleyen araştırmacılar B5 ortamının MS ortamına göre sürgün rejenerasyonunu daha fazla teşvik ettiğini ve büyüme düzenleyiciler içinde de 1 mg/litre BAP + 0.2 mg/litre NAA +0.4 mg/litre IAA karışımının en iyi sonucu verdiğini belirtmektedirler.

Ebrahimie et al. (2006), *Cuminum cyminum* L. türüne ait farklı endemik genotiplerin sürgün rejenerasyonları üzerine farklı uygulamaların etkisini araştırmışlardır. Çalışmada B5 besin ortamına BAP, NAA ve IAA ilave edilmiştir. Denemede en etkili sürgün rejenerasyonu 0.8 mg/litre NAA + 0.3 mg/litre IAA ile zenginleştirilmiş B5 ortamından elde edilmiştir. Araştırmacılar genotipler arasında sürgün rejenerasyonu bakımından önemli bir fark oluşmadığını ve bu türe ait farklı genotiplerde in vitro rejenerasyon yönteminin başarıyla uygulanabileceğini ve fenotipik olarak normal bitkiler elde edilebileceğini belirtmektedirler.

Tiwari et al. (2007), soğanda embrogenik süspansiyon kültürünün bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoların MS besin ortamına NAA, 2,4-D, BAP ve kinetinin değişik konsantrasyonları ilave edilmiş ve en etkili bitki rejenerasyonu MS + 0.5 mg/litre NAA + 0.5 mg/litre BAP + 0.5 mg/litre kinetin ortamında gerçekleşmiştir. Araştırmada 4.0 mg/litre 2,4-D ve 0.5 mg/litre BAP karışımı suspension kültür olarak en etkili bulunmuştur. Çalışmada MS besin ortamına 2.0 mg/litre 2,4-D + 0.5 mg/litre BAP ilave edilen ortamda tatminkar düzeyde embriyo gelişimi gözlenmiştir.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002), arpada farklı besin ortamları ve bunların kombinasyonlarının embriyo kültürünün başarısına etkisini araştırdıkları çalışmada olgun arpa embriyolarını Murashige and Skoog (MS), 1/2 MS, Randolph and Cox ortamı (RC) ve Gamborg ortamı (B5) olmak üzere 4 farklı besin ortamında kültüre almışlardır. Araştırmacılar en yüksek bitki rejenerasyon oranını %92.1 ile RC ortamından elde ederken, bu ortamı % 91.3 ile MS, % 87.7 ile 1/2 MS ve % 85.7 ile B5 ortamlarının izlediğini ve ortamlar arasında istatistiksel bir farkın oluşmadığını belirtmektedirler. Araştırmacılar

sterilizasyon yöntemleri arasında tohumların % 70'lik ethanole daldırıldıktan sonra 15 dk süreyle % 2 sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilerek 5-6 kez steril distile suda bekletildikten sonra 30 dakika antibiyotik solüsyonu içinde beklettikleri yöntemin en etkili sterilizasyon yöntemi olduğunu belirtmektedirler.

Zhang et al. (2003), *Brassica napus* x *B. Juncea* ve bunların resiprokal melezlerinden embriyo kültürü yoluyla türler arası hibritler üretmek üzere yaptıkları çalışmada 15 günlük embriyolarda bitki rejenerasyonu en etkili olurken 10 günlük embriyolarda kallus oluşumunun daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar kullandıkları ortamlardan 0.3 mg/litre NAA + 1.5 mg/litre BAP karışımında % 55.43 kallus oluşumunu ve % 26.65 bitki rejenerasyonu; 0.3 mg/litre NAA + 20 mg/litre BAP karışımında % 66.98 kallus oluşumu ve % 24.61 bitki rejenerasyonu elde etmişlerdir. Denemede MS hazır besin ortamını kullanan araştırmacılar en iyi sonucu bu uygulamanın verdiğini belirtmektedirler.

*Medicago scutellata* ve *M. sativa* türlerine ait bitkilerde embriyo kültürü uygulayan Baughan (1987), kendilediği bitkilerden farklı dönemlerde aldığı zigotik embriyoları MS besin ortamında kültüre almıştır. Büyüme düzenleyici olarak 2,4-D, IAA, BAP ve kinetinin farklı dozlarının kullanıldığı çalışmada kalp ve torpedo şeklindeki (dönemlerindeki) embriyolarda başarı oranının en yüksek olduğu (% 27.5) belirlenmiştir. Büyüme düzenleyiciler arasında ise en iyi performansı 0,05 mg/litre IAA ve 0,05 mg/litre BAP göstermiştir.

Slesak and Przywara (2003), *Brassica napus* (L.)'un olgunlaşmamış embriyolarının kültüründe karbonhidrat kaynağı olarak fruktoz, glukoz, maltoz ve sucrose'un değişik konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Temel besin ortamı olarak MS kullanılan çalışmada ortam pH'sı 5,7 - 5,8'e ayarlanmıştır. Kalp şekilli embriyoları kullanan araştırmacılar şeker kaynağı olarak % 9 veya % 12 sucrose ile % 12 maltose'un sürgün oluşumu için en iyi sonucu verdiğini belirtmektedirler.

Schryer et al. (2005), *Phaseolus angustissimus*'ta erken dönemde alınan embriyoların rejenerasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada tozlaşmadan 1, 2 ve 3 gün sonra aldıkları baklaları besin ortamında 1 ve 2 hafta süreyle kültür ortamında bekletmişlerdir. Baklalardan aldıkları embriyoları besin ortamına aktaran araştırmacılar 1

haftalık baklılardan alınan embriyolarda başarı oranlarını 1, 2 ve 3 günlük embriyolar için sırasıyla % 4.0, % 20.2 ve % 29.3 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar embriyo yaşı büyüdükçe bitki rejenerasyonunda başarı oranının arttığını belirtmektedirler.

*Brassica napus* türüne ait dihaploid bitkilerde olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyo elde etmek için yürütülen çalışmada tozlaşmadan 14-15, 20-21 ve 28-29 gün sonra aldıkları embriyoları 3 farklı pH derecesine sahip (pH 3.5, pH 4.0, pH 5.0) MS besin ortamında deneyen Burbulis and Kupriene (2005), pH 3.5 olan ortamda başarı elde edememiş ve en iyi sonucu pH'nın 5.0 olduğu ortamdan elde etmişlerdir. Araştırmacılar olgun embriyolarda başarılı sonuçlar alamadıklarını ve en uygun embriyo alım döneminin tozlaşmadan sonraki 20-21. günler olduğunu belirtmektedirler.

Soya fasulyesinde zigotik embriyolardan alınan farklı explantların somatik embriyo kültüründe kültüre alındığı çalışmada 4 çeşit, 2 pH derecesi (pH 5,7 ve 7,0) ve katılaştırıcı ortam olarak agar ve gelrite kullanılan çalışmada genotipler arasında genelde önemli bir farkın olmadığı, ortam pH'sının 7,0 olması durumunda 5,7'ye göre sürgün rejenerasyonunun arttığı ve katılaştırıcı ortam olarak da gelrite'nin agara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Santarem et al., 1997).

Embriyo kültürü tekniğinde izole edilen embriyoların, katı ortamda kültüre alınması sıvı besin ortamına göre daha başarılıdır. Embriyonun ihtiyaç duyduğu besin maddeleri olgunluk derecesine göre değişmektedir. Örneğin olgun embriyolar şeker ve bazı mineral tuzları içeren basit besin ortamlarında kolayca gelişebilmektedirler. Oysa olgunlaşmamış embriyoların besin istekleri daha farklıdır. Türler ve embriyo yaşına göre değişmekle beraber farklı oranlarda oksin, sitokinin, gibberalin, vitamin ve hormon gibi ilave maddelere de ihtiyaç duyulmaktadır (Gönülşen, 1987).

Christopher and Rajam (1996), kırmızı biberde genotip, ortam ve explantların in vitro rejenerasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada *Capsicum praetermissum*, *C. baccatum* ve *C. annum* türlerine ait hipokotil, kotiledon ve yaprak explantlarını kullanmışlardır. Çalışmada MS besin ortamı içine 5,7  $\mu$ M IAA + 13,3  $\mu$ M BA; 22  $\mu$ M BA ve 44  $\mu$ M BA ilave eden araştırmacılar genotip x explant interaksiyonunu önemsiz bulmuşlardır. Optimal sürgün rejenerasyonu bakımından en uygun büyüme düzenleyici

olarak 22  $\mu$ M BA'nın bulunduğu çalışmada bitkilerin ortalama %60-70'inin gelişmelerini devam ettirdikleri belirlenmiştir.

Choi et al. (2003), *Vigna unguiculata*'da olgunlaşmamış zigotik embriyolardan aldıkları kotiledon explantlarını ve embriyoları MS besin ortamında kültüre almışlardır. Farklı benzyladenin (BA) konsantrasyonlarının explantların ve olgunlaşmamış embriyoların sürgün oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada en yüksek sürgün oluşum oranı % 67.5 ile 1.0 mg/dm<sup>3</sup> BA uygulamasından elde edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Deneme Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü doku kültürü laboratuvarı ve seralarında 2005-2006 yıllarında yürütülmüştür. Denemede 10 farklı domates genotipi kullanılmıştır. Denemede kullanılan 10 domates genotipinin 8 tanesi 2004-2005 yıllarında Tokat'ta yürütülen domates çeşit adaptasyon çalışmasında üstün performans gösteren F<sub>1</sub> hibrit çeşitler arasından seçilmiştir. 2006 yılında Cemile F<sub>1</sub>, Sümela F<sub>1</sub>, Menhir F<sub>1</sub>, Alida F<sub>1</sub>, Diyansa F<sub>1</sub>, Newton F<sub>1</sub>, RS 400 F<sub>1</sub> ve Astona F<sub>1</sub> sırtık domates çeşitlerinden F<sub>2</sub> döllerinde elde edilmiş ve embriyo kültüründe bu genotipler kullanılmıştır. Ayrıca Tokat Turhal ilçesinden 1 ve Niksar ilçesinden 1 olmak üzere 2 yerel oturak (bodur) domates popülasyonuna ait genotipler de denemede kullanılmıştır. Böylece denemede toplam 10 genotip üzerinde çalışılmıştır. Ancak kendileme döneminde Niksar ilçesinden alınan popülasyona ait bitkilerde kendilemelerde başarı oranı çok düşük olduğundan bu popülasyonun bitkilerine ait meyvelerden yeterli tohum elde edilememiş ve bunun üzerine bu genotip denemeden çıkartılmıştır. Böylece embriyo kültürü çalışmaları 9 genotip üzerinde yürütülmüştür. Denemede kullanılan domates genotipleri ve kod numaraları Çizelge 3. 1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Denemede kullanılan genotipler

| Kod adı | Genotip adı                                         | Kod adı | Genotip adı                                        |
|---------|-----------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|
| 02      | Cemile F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu)  | 13      | Newton F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu) |
| 03      | Sümela F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu)  | 18      | RS 400 F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu) |
| 07      | Menhir F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu)  | 28      | Astona F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu) |
| 09      | Alida F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu)   | CA      | Tokat-Turhal orijinli popülasyon                   |
| 10      | Diyansa F <sub>1</sub> (F <sub>2</sub> generasyonu) |         |                                                    |

Denemede kullanılan genotiplere ait bitkilerin yetiştirilmesi, kendilemelerin yapılması ve embriyo kültüründen elde edilen bitkilerin saksılara aktarıldıktan sonra çiçeklenme dönemine kadar geçen devrede yetiştiriciliklerinin yapılmasında ısıtmasız cam seralar kullanılmıştır.

Kendilemelerden sonraki dönemde meyvelerden embriyoların alınması, embriyoların besin ortamlarına aktarılması ve *in vitro* şartlarda bitkilerin gelişmelerinin sağlanması için doku kültürü laboratuvarı ve ışık, sıcaklık ve ortam neminin kontrol edilebildiği iklimlendirme odası kullanılmıştır.

Embriyo kültüründe temel besin ortamı olarak MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Denemede 1 litre MS besin ortamı hazırlamak için 30 gram sakkaroz ve 8 gram agar kullanılmıştır. Araştırmada MS besin ortamının hazırlanmasında kullanılan makro ve mikro elementler ile vitaminler ve kullanılan miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Denemede MS besin ortamının hazırlanmasında kullanılan makro ve mikro elementler ile vitaminler ve bunların kullanılan dozları Demirel and Seniz (1997) ile Ellialtıoğlu ve Abak (1986) dikkate alınarak planlanmıştır.

**Çizelge 3. 2.** Denemede kullanılan MS besin ortamının bileşimi

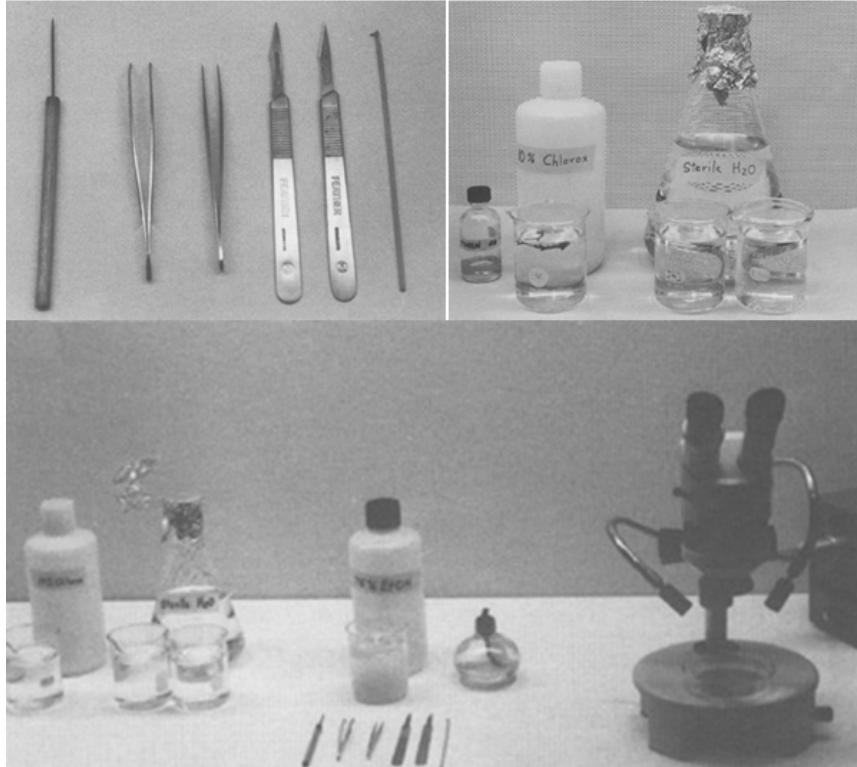
| <b>Makro Elementler</b>              | <b>(g/l)</b> | <b>Mikro Elementler</b>                              | <b>(mg/l)</b> | <b>Vitaminler</b> | <b>(mg/l)</b> |
|--------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------|---------------|-------------------|---------------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 16.50        | KI                                                   | 83.00         | Myo-Inositol      | 1000.00       |
| K NO <sub>3</sub>                    | 19.00        | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 620.00        | Nicotinic Acid    | 50.00         |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 4.40         | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | 1560.00       | Pyridoxine-Hcl    | 50.00         |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 3.70         | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 860.00        | Thiamine          | 50.00         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1.70         | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O | 25.00         |                   |               |
|                                      |              | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 2.50          |                   |               |
|                                      |              | CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | 2.50          |                   |               |
|                                      |              | FeSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | 2780.00       |                   |               |
|                                      |              | Na <sub>2</sub> -EDTA                                | 3.730.00      |                   |               |



Çalışmada MS besin ortamına etkilerini araştırmak maksadıyla değişik bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Çizelge 3.3'te verilen büyüme düzenleyiciler ve kullanılan miktarları Ellialtıoğlu ve Abak (1986) dikkate alınarak düzenlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Denemede kullanılan büyüme düzenleyici maddeler

| Büyüme Düzenleyicileri | Miktar (mg/l) |
|------------------------|---------------|
| Kinetin                | 0.1           |
| IAA                    | 0.1           |
| Kinetin+IAA            | 0.1+0.1       |
| NAA+BAP                | 1+1           |



**Şekil 3.1.** Denemede kullanılan laboratuvar malzemeleri

Denemede tohum taslaklarından embriyoların izole edilmesinde bisturi ve ince uçlu pens; alet ve ekipmanın sterilizasyonunda alkol; besin ortamlarının hazırlanması ve çözeltinin konması için değişik hacimlerde beher glaslar, cam petri kapları; petrilere bitkilerin aktarıldığı cam tüpler; steril ortam için laminar flow kabin v.b. laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır (Şekil 3.1).

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Kendilemelerin Yapılışı**

Denemede kullanılan donör bitkilerin tohumları içinde torf bulunan viyollere ekilmiştir. Bitkiler fide yetiştirme kaplarında 3-4 gerçek yapraklı döneme geldiklerinde içlerinde torf bulunan 3 numara saksılara aktarılmışlardır. Bu saksılarda 7-8 gerçek yaprak oluşturunca kadar büyütülen bitkiler daha sonra ısıtmasız cam seraya dikilmişlerdir. Serada dar sıra arası 50 cm, geniş sıra arası 100 cm ve sıra üzeri 40 cm olacak şekilde dikilen bitkilerin yetiştiriciliği ve bakım işlemleri Sevgican (2002)'a göre yapılmıştır.

Bitkiler üzerinde çiçeklerin oluşmaya başladığı dönemde kendilemelere başlanmıştır. Kendilemeler yapılmadan önce tomurcuk aşamasına gelen çiçekler polen geçişine izin vermeyecek şekilde bir tülbentle örtülmüştür. Daha sonra stamen ve pistillerin olgunlaştığı ve çiçeğin taç yapraklarının çiçek eksenine ile 45° açı yapacak şekilde açıldığı dönemde tülbentler açılmış, ince uçlu bir pens kullanılarak çiçeğin kendi anterlerinden alınan polenler dışıca tepciği üzerine bulaştırılmıştır. Tozlama yapıldıktan sonra çiçek tekrar tülbentle kapatılmıştır. Kendilemeler genellikle sabah 08:00-10:00 saatleri arasında yapılmıştır. Kendilemeler yapılırken yabancı polen bulaşmasını önlemek için her defasında pensler alkol ile muamele edilmiştir. Kendileme işlemi tamamlanan çiçeklere üzerinde genotip adı ve kendileme tarihi yazılı bir etiket bağlanmıştır. Kendilemelerde ağırlıklı olarak 2. salkımdaki çiçekler kullanılmış, kendilenen çiçek sayısının yetersiz olduğu durumlarda kendileme için 3. salkımdaki çiçekler de kullanılmıştır. Kendilemelerde kullanılan yöntemler Pearson (1983) dikkate alınarak belirlenmiştir.

Kendilemelerden yaklaşık 7-10 gün sonra çiçekler kontrol edilmiş, döllenmenin gerçekleşmediği çiçeklerin yerine tekrar kendilemeler yapılmıştır. Döllenmenin gerçekleştiği çiçeklerde izolasyon tülbentleri tozlamadan yaklaşık 7-10 gün sonra uzaklaştırılmıştır. Bu dönemde ovaryumların ortalama 1-1,5 mm çapa ulaştıkları gözlenmiştir.



Şekil 3.2. Kendileme sonrasında farklı dönemlerdeki meyvelerin görünüşü

Denemede kendilemesi yapılan çiçeklerin kendileme tarihleri kaydedilmiştir. Kendileme tarihinden itibaren 20-24-28-32 ve 36 gün sonra meyveler o günün akşamında hasat edilmiş ve etiketleri ile birlikte laboratuara getirilmiştir. Laboratuarda oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 gece bekletildikten sonra ertesi gün meyvelerden embriyolar alınarak kültür ortamına konmuştur.

### 3.2.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması

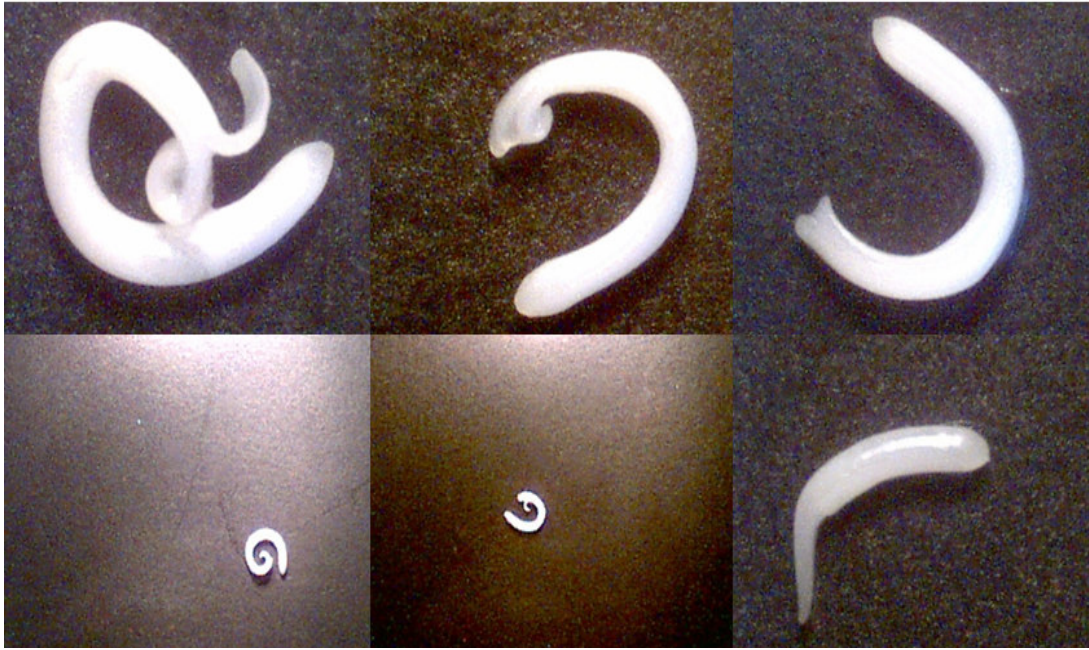
Araştırmada temel besin ortamı olarak MS ( Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. MS besin ortamı Çizelge 3.1'de belirtilen elementler ve vitaminler kullanılarak laboratuvar koşullarında hazırlanmıştır. Temel besin ortamına Çizelge 3.2'de belirtilen kombinasyonlarda büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Bu maksatla MS ortamına 0.1mg/litre kinetin, 0.1 mg/litre IAA, 0.1 mg/litre kinetin + 0.1 mg/litre IAA ve 1 mg/litre NAA + 1 mg/litre BAP ilave edilerek 4 farklı ortam hazırlanmıştır. Denemede büyüme düzenleyicilerin etkilerini karşılaştırmak maksadıyla kontrol uygulaması olarak MS besin ortamı saf olarak kullanılmıştır. Böylece denemede toplam 5 ortam kullanılmıştır. Denemede çok sayıda muamelenin kullanılması nedeniyle her defasında ortamın yeniden hazırlanması yerine makro ve mikro elementler ile vitaminler Çizelge 3.1'de belirtilen oranlar kullanılarak stok çözelti hazırlanmıştır. Benzer şekilde denemede kullanılan hormonlar için de stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan maddeler % 100 saf kimyasallar olarak kullanılmış ve stok çözeltiler + 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Besin ortamlarının pH'sı 0.1N NaOH kullanılarak 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. Beherglastaki besin ortamı manyetik karıştırıcı ile hem ısıtılmış hem de homojen karışmasını sağlamak için sürekli karıştırılmıştır. Ortam sıcaklığı 80°C ye ulaştığında şeker ve agarın iyice eriyerek homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmiştir. Kaynamaya izin verilmeden manyetik karıştırıcıdan alınıp ağızları alüminyum folyo ile kapatılıp 20 dakika süreyle 121°C'ye ayarlı olan otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besin çözeltisi aseptik koşullara sahip olan steril kabin içerisinde önceden 90 dakika otoklav yapılarak sterilize edilen petri kaplarına aktarılmıştır. Her petri kabına 1/3 'ü

dolacak şekilde ortam konmuştur. Daha sonra besin ortamların jel kıvamına gelmesi için soğumaya bırakılmıştır.

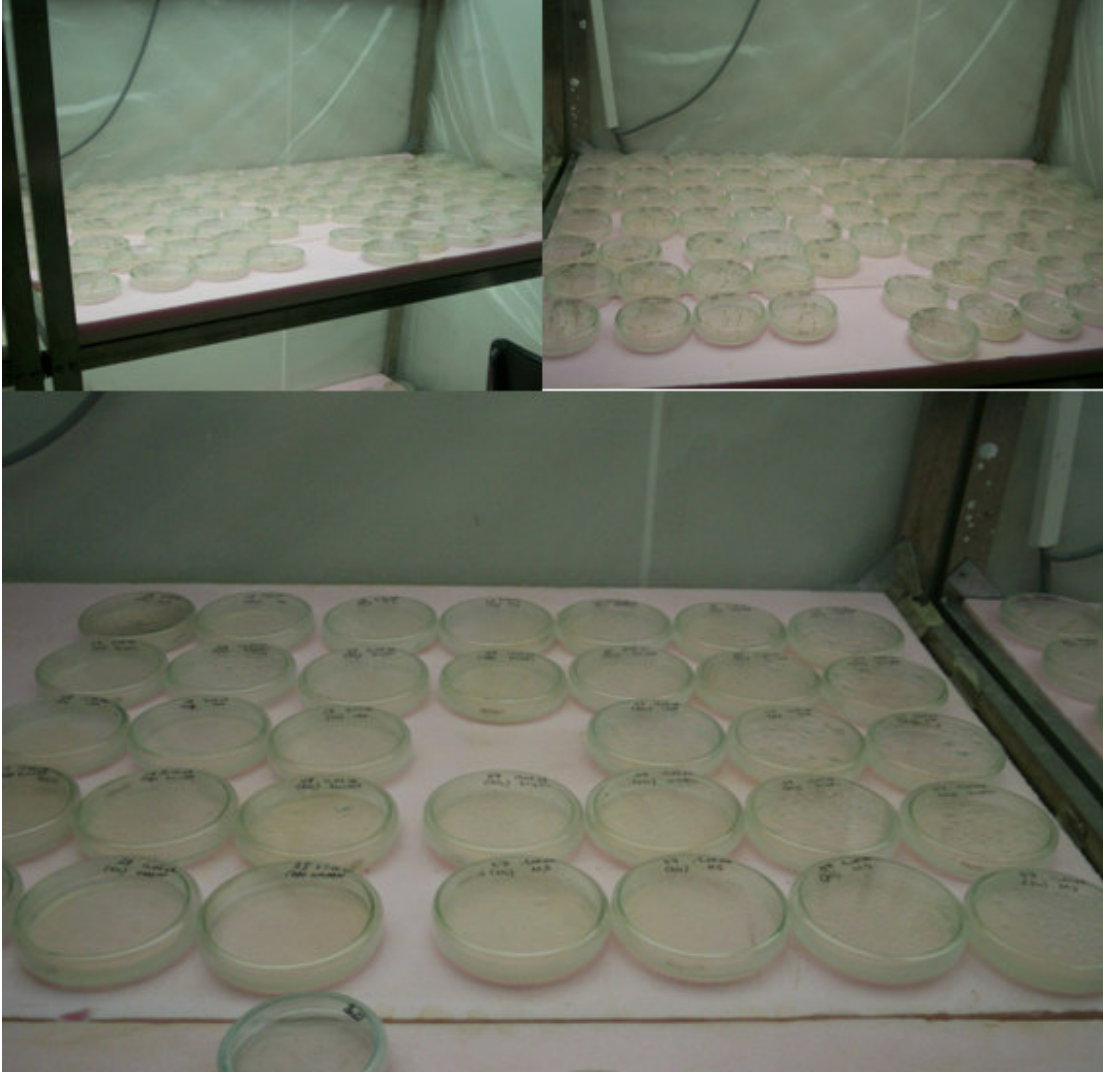
### 3.2.3. Embriyoların Çıkartılması ve Kültür Ortamına Aktarılması

Embriyoları çıkarılacak olan meyveler steril kabin içerisine alındıktan sonra embriyolar tohum içerisinde steril bir ortamda bulunduğu için sadece meyvelerin dış yüzeyi dezenfekte edilmiştir. Meyveler %96'lık etil alkole daldırılıp birkaç saniye bekletilmiş ve hemen sonra aleve tutularak "alkol+kuru yakma" yöntemiyle dezenfekte edilmiştir. Dezenfekte edilen meyveler boyuna dilimlere ayrılmış, meyve içerisindeki tohum taslakları çıkarılarak binoküler mikroskop altındaki steril filtre kağıdı üzerine alınmıştır. Tohumu saran jelimsi tabaka filtre kağıdı tarafından emilerek embriyo alınmıştır. Tohumu saran jelimsi tabaka filtre kağıdı tarafından emilerek embriyo alınırken kaygan yapının olmaması sağlanmıştır. Pens ve bisturi yardımı ile embriyolar zarar verilmeden tohum taslaklarından çıkartılıp cam petrilerdeki besin ortamı üzerine yerleştirilmiştir. Beş farklı besin ortamına ayrı ayrı 40'ar adet embriyo yerleştirilmiştir.



**Şekil 3.3.** Besin ortamına aktarılmaya hazır farklı yaşlardaki embriyolar





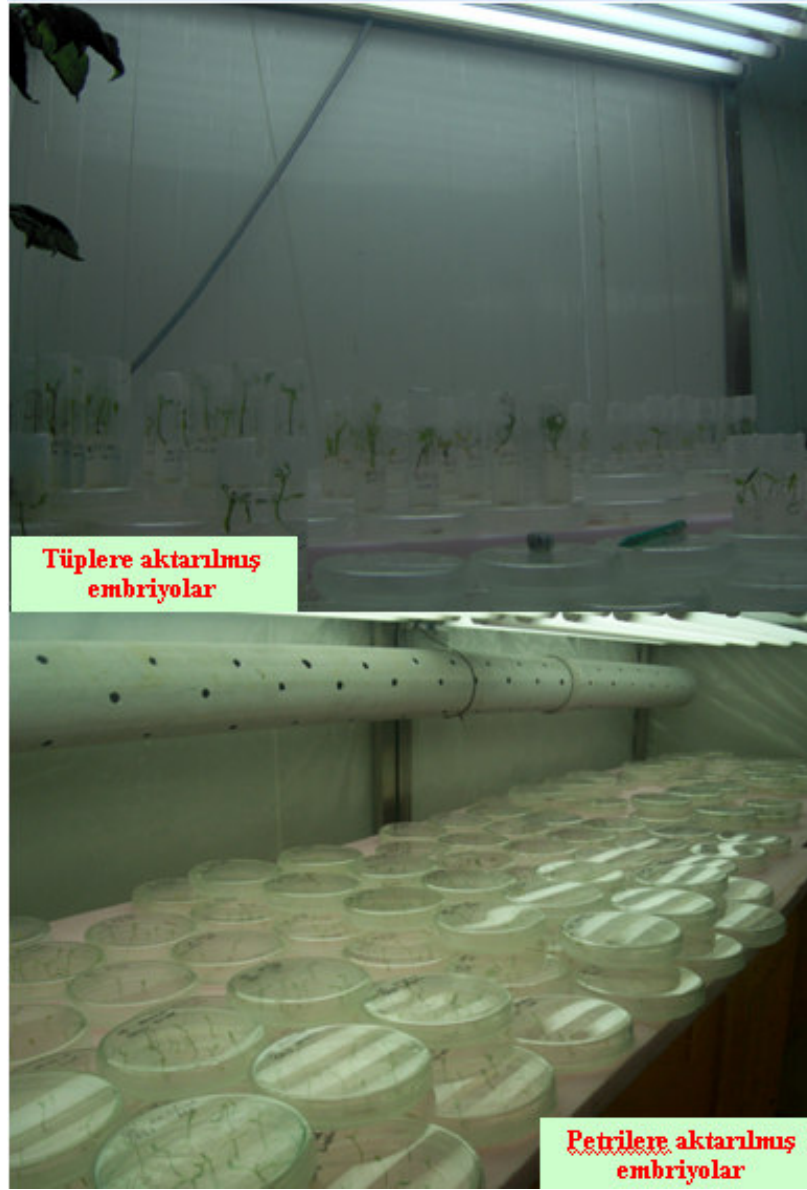
**Şekil 3.4.** Embriyoların petrilere aktarılmış durumları

Denemede her embriyo için 4 petri kabı kullanılmış ve her petri kabına 10 embriyo yerleştirilmiştir. Daha sonra petrilerin etrafı parafilm ile kapatılıp dışarıdan enfeksiyon girişi engellenmiştir. Üzerlerine embriyo yaşı, kendileme tarihi, embriyoların aktarıldıkları tarih ve genotipin adı yazılan petriler iklim odasındaki raflara yerleştirilmiştir.

Tüm bu işlemler sırasında pens ve bistürü sık sık önce % 96'lık alkole batırılmış ve hemen ardından aleve tutularak sterilize edilmiştir. Çalışma esnasında ortama sürekli alkol

püskürtülmüş ve eller alkolle yıkanmıştır. Böylece olabilecek herhangi bir bulaşmanın önüne geçilmiştir.

#### 3.2.4. Kültür Koşulları



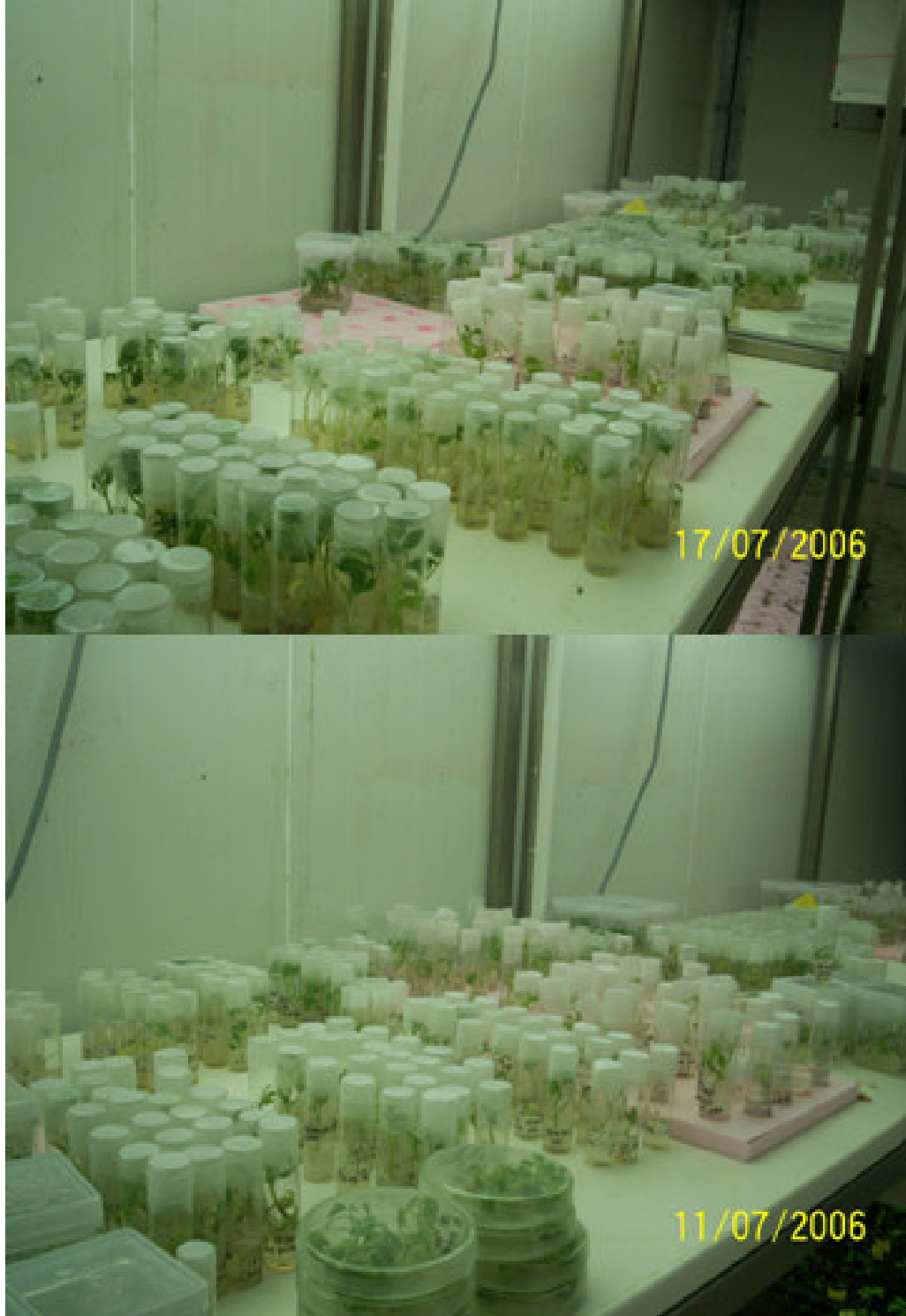
Şekil 3.5. Embriyoların kültüre alındığı ortamın genel görünümü

Embriyoların kültür ortamında gelişmeleri için yerleştirildikleri iklimlendirme odası raflı sisteme sahip ışık, sıcaklık, hava nisbi nemi ve ışıqlanma süresi otomatik olarak kontrol edilebilen bir ortam özelliğinde olup, ortam sıcaklığı  $24\pm 2$  °C ye ve hava oransal nemi % 65'e ayarlanmıştır, iklimlendirme odasında 15 bin lux ışık intensitesi oluşturulmuştur. Zaman saati kullanılarak iklimlendirme odası 16/8 saat gündüz/gece esasına göre aydınlatılmıştır.



**Şekil 3.6.** Cam tüplere aktarılmış bitkilerin genel görünümü





Şekil 3.7. Saksılara aktarılmaya hazır bitkiler



**Şekil 3.8.** Dış koşullara alıştırma dönemindeki bitkilerin genel görünümü

### 3.2.5. Bitkilerin Tüplere Aktarılması ve Dış Koşullara Adaptasyonu

Embriyolar petri kaplar içinde kültüre alındıktan 4 gün sonra gelişmeye başlamışlardır. Kültür ortamına alındıktan 15 gün sonra yeterli kök oluştuğu kanaatine varılmış ve kotiledon yaprakların açıldığı, gerçek yaprakların gelişmeye başladığı bu dönemde bitkiler içinde sadece MS besin ortamı bulunan tüplere aktarılmıştır. Tüp içinde 7-10 gün süreyle gelişimini devam ettiren bitkiler daha sonra fide kaplarına şaşırtılmıştır.

Bitkilerin gerek fide kaplarında geliştikleri dönemde ve gerekse fide kaplarından 3 numara saksılara aktarıldıkları devrede iklimlendirme odasında dış koşullara alıştırmaları sağlanmıştır. Alıştırma döneminde bitkilerin su kaybını önlemek için bir hafta süreyle nemlendirme cihazı ile ortam nemi %75-80 ve ortam sıcaklığı  $20 \pm 2$  °C'ye ayarlanmıştır. Bitkiler sulanırken steril saf su kullanılmıştır. Alıştırma döneminin sonunda bitkiler % 60-65 nem ve  $25 \pm 2$  °C sıcaklık ortamında normal gelişmelerini devam ettirmişlerdir. Daha sonra çiçeklenme dönemine kadar bekletilmek üzere ısıtmasız cam seraya aktarılmışlardır.

### **3.2.6. Denemede Yapılan Gözlemler**

#### **3.2.6.1. Embriyo Gelişiminde Başarı Oranlarının Belirlenmesi**

Denemede petrilere aktarılan embriyolardan gelişerek dış koşullara adapte olabilen bitkilerin sayıları belirlenmiş ve başlangıçta petrillerdeki embriyo sayısı (40) ile oranlanarak başarı oranları % olarak hesaplanmıştır.

#### **3.2.6.2. Çiçeklenmeye Kadar Geçen Sürenin Belirlenmesi**

Denemede kendilemelerin yapıldığı tarihten itibaren çiçeklenmeye kadar geçen süreler belirlenmiştir. Bu maksatla her tekerrürdeki bitkilerin % 50'sinde ilk çiçeklerin olduğu tarihler kaydedilmiştir. Kendileme tarihlerinden çiçeklenme tarihine kadar geçen süre gün olarak hesaplanmıştır.

Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre ve 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür (Düzgüneş, ve ark.1983). Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde TARIST analiz yöntemi kullanılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Denemede MS besin ortamına ilave edilen oksin ve stokinin kombinasyonları arasında MS + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP muamelesinde embriyo gelişimi sağlanamamıştır. Denemede kullanılan 9 genotipe ait farklı yaşlardaki embriyoların hiçbirinde bitki elde edilememiştir. Besin ortamına aktarılan embriyolarda kültür ortamına alındıktan 5-7 gün sonra kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Kallus oluşumunun devam ettiği bu uygulamada embriyolar 40 gün süreyle bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda bitki gelişiminin görülmemesi üzerine denemedeki bu uygulamalar gözlem dışı bırakılmıştır.



**Şekil 4.1.** NAA + BAP ortamında kallus oluşturmuş embriyoların genel görünümü

Büyüme düzenleyici olarak BAP ve NAA'ı saf veya değişik kombinasyonlarda uygulayan araştırmacılar bu maddeleri daha çok kallus oluşturmak maksadıyla kullandıklarını ve kallus oluşumunu müteakiben genellikle 40-45. günden sonra kalluslardan sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini vurgulamaktadırlar (Bojnauth et al., 1998; Turgut, et al., 1998; Nolan and Rose, 1998; Zhang, et al., 2003; Oduyayo et al., 2005; Reddy, 2005). Bizim çalışmamızda esas amaç en kısa sürede embriyolardan bitkilerin elde edilmesi olduğundan MS + 1 mg/litre BAP + 1 mg/litre NAA ortamında kallus oluşturan embriyoların sürgün rejenerasyonu oluşturmaları beklenmemiştir. Besin ortamı içinde kallus oluşturan embriyolarda sürgün rejenerasyonunun başlangıç belirtileri görülmekle beraber gerek diğer ortamlara göre ve gerekse tohumdan çiçeklenmeye kadar gözlem yapılan kontrol uygulamalarına göre daha uzun zaman gerekeceğinden bu uygulamanın çalışmada hedeflenen beklentilerin çok uzağında kalacağı kanaatine varılmıştır.

#### 4.1. Embriyo Kültürü Başarı Oranları

Embriyoların bitkiye dönüşümünde genotipler, besin ortamları ve embriyo yaşları arasında en etkili faktörün embriyo yaşı olduğu görülmektedir. Denemede en düşük başarı oranı % 55,22 ile CA genotipinden alınan 20 günlük embriyolardan MS+Kinetin uygulamasından elde edilirken, en yüksek başarı oranı 28, 32 ve 36 günlük embriyoların bazı uygulamalarından %100 olarak elde edilmiştir. Başarı oranları incelendiğinde genotipler ve besin ortamları arasındaki fark önemsiz çıkarken, genotip x embriyo yaşı x besin ortamı interaksyonu 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.1). Denemede üçlü interaksyonun önemli çıkmasında esas etken faktör embriyo yaşları arasındaki farkın önemli çıkması olmuştur.

Embriyo yaşları dikkate alındığında ortalama başarı oranı % 63,31 ile 20 günlük embriyolarda en düşük, % 98,10 ile 32 günlük embriyolarda en yüksek çıkmıştır. Embriyo yaşları arasındaki fark 0,01 düzeyinde, embriyo yaşı x ortam interaksyonu 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Üçlü interaksyonda olduğu gibi ikili interaksyonda da istatistiksel anlamda önemli farklılıkların çıkması embriyo yaşının etkisinden kaynaklanmaktadır.

Denemede 20 günlük embriyolarda bitkiye dönüşüm oranları çalışmadaki en düşük oranlar olarak belirlenmiştir. Bu dönemdeki embriyoların alınmasında karşılaşılan zorluklar başarı oranlarının düşmesinde etkili olmuştur. Bu dönemdeki embriyolar henüz daha yeterli düzeyde gelişmediklerinden çok küçük yapıdadırlar. Çıplak gözle alınmaları mümkün olmayan bu embriyoların tohum taslaklarından alınmaları esnasında mekanik yaralanmalar oluşmuş ve hatta embriyolarda kökçük kısmında ve kotiledon yapraklarında kopmalar meydana gelmiştir. Bu tip zararlanmalara uğrayan embriyoların bitkiye dönüşemedikleri gözlenmiştir. Ayrıca 20 günlük embriyoların tohum taslaklarından alınmaları esnasında daha fazla iş gücü gerekmektedir. Başarı oranları bakımından 20 günlük embriyolara oranla 24 günlük embriyolarda başarı oranları daha yüksek olmuş, ancak 28, 32 ve 36 günlük embriyolara göre düşük kalmıştır. 24 günlük embriyolarda başarı oranının düşük olması, 20 günlük embriyolarda yaşanan zorlukların kısmen de olsa bu dönemdeki embriyolarda da yaşanmasından kaynaklanmaktadır. Denemede en yüksek başarı oranı 32 günlük embriyolardan elde edilmiştir. Bu dönemdeki embriyoların meyvelerden kolayca izole edilmeleri, embriyoların alınması esnasında mekanik zarara uğramamaları ve embriyoların endospermden kolayca ayrılmaları başarı oranının artmasında etkili olmuştur. Buna bağlı olarak harcanan el emeği de daha az olmuştur.

Araştırmada embriyo yaşı büyüdükçe başarı oranının artmasına karşın 36 günlük embriyolarda başarı oranı 32 günlük embriyolarda elde edilen başarı oranından daha düşük olmuştur (fark istatistiksel olarak önemli değildir). Embriyolarda yaş ilerledikçe tohum kabuğu şekillenmekte ve tohum içinde endosperm katılaşmaktadır. Bu dönemde endospermin sertleşmesi nedeniyle embriyoların alınmasında zorluklarla karşılaşmaktadır. Özellikle katılaştan endospermden embriyoların izole edilmesi zorluklar çıkarmış ve buna bağlı olarak da embriyoların radikula veya kotiledon yapraklarında yaralanmalar veya kopmalar meydana gelmiştir. Bu tip zararlanmalara uğrayan embriyolarda kallus oluşumu gözlenmiş ancak bitki elde edilememiştir.

**Çizelge 4.1.** Genotiplere, embriyo yaşlarına ve ortamlara göre başarı oranları (%)

| Genotipler                                                                                         | Embriyo yaşı | MS     | KİNETİN | IAA    | KİNETİN + IAA | ORTALAMA |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------|---------|--------|---------------|----------|-------|
| 02                                                                                                 | 20           | 70.28  | 60.24   | 62.75  | 65.26         | 64.63    | 87.66 |
|                                                                                                    | 24           | 85.34  | 75.30   | 87.85  | 90.36         | 84.71    |       |
|                                                                                                    | 28           | 100.00 | 87.85   | 95.38  | 95.38         | 94.65    |       |
|                                                                                                    | 32           | 100.00 | 97.89   | 97.89  | 100.00        | 98.95    |       |
|                                                                                                    | 36           | 95.38  | 92.87   | 97.89  | 95.38         | 95.38    |       |
| 03                                                                                                 | 20           | 75.30  | 67.77   | 80.32  | 82.83         | 76.56    | 91.12 |
|                                                                                                    | 24           | 85.34  | 82.83   | 85.34  | 85.34         | 84.71    |       |
|                                                                                                    | 28           | 100.00 | 97.89   | 100.00 | 97.89         | 98.95    |       |
|                                                                                                    | 32           | 100.00 | 100.00  | 100.00 | 100.00        | 100.00   |       |
|                                                                                                    | 36           | 97.89  | 95.38   | 95.38  | 92.87         | 95.38    |       |
| 07                                                                                                 | 20           | 60.24  | 57.73   | 60.24  | 57.73         | 58.99    | 85.59 |
|                                                                                                    | 24           | 85.34  | 77.81   | 82.83  | 80.32         | 81.58    |       |
|                                                                                                    | 28           | 95.38  | 92.87   | 95.38  | 95.38         | 94.75    |       |
|                                                                                                    | 32           | 97.89  | 95.38   | 97.89  | 95.38         | 96.64    |       |
|                                                                                                    | 36           | 95.38  | 95.38   | 95.38  | 97.89         | 96.01    |       |
| 09                                                                                                 | 20           | 65.26  | 60.24   | 62.75  | 65.26         | 63.38    | 87.02 |
|                                                                                                    | 24           | 82.83  | 77.81   | 85.34  | 82.83         | 82.20    |       |
|                                                                                                    | 28           | 97.89  | 92.87   | 100.00 | 97.89         | 97.16    |       |
|                                                                                                    | 32           | 97.89  | 87.85   | 100.00 | 100.00        | 96.44    |       |
|                                                                                                    | 36           | 100.00 | 92.87   | 95.38  | 95.38         | 95.91    |       |
| 10                                                                                                 | 20           | 65.26  | 55.22   | 60.24  | 62.75         | 60.87    | 86.43 |
|                                                                                                    | 24           | 85.34  | 75.30   | 82.83  | 80.32         | 80.95    |       |
|                                                                                                    | 28           | 97.89  | 92.87   | 95.38  | 95.38         | 95.38    |       |
|                                                                                                    | 32           | 100.00 | 92.87   | 97.89  | 100.00        | 97.69    |       |
|                                                                                                    | 36           | 97.89  | 95.38   | 97.89  | 97.89         | 97.26    |       |
| 13                                                                                                 | 20           | 62.75  | 57.73   | 60.24  | 60.24         | 60.24    | 85.19 |
|                                                                                                    | 24           | 85.34  | 77.81   | 85.34  | 82.83         | 82.83    |       |
|                                                                                                    | 28           | 95.38  | 87.85   | 92.87  | 92.87         | 92.24    |       |
|                                                                                                    | 32           | 100.00 | 95.38   | 97.89  | 95.38         | 97.16    |       |
|                                                                                                    | 36           | 97.89  | 90.36   | 92.87  | 92.87         | 93.50    |       |
| 18                                                                                                 | 20           | 62.75  | 60.24   | 62.75  | 62.75         | 62.12    | 84.96 |
|                                                                                                    | 24           | 82.83  | 77.81   | 82.83  | 80.32         | 80.95    |       |
|                                                                                                    | 28           | 92.87  | 87.85   | 92.87  | 90.36         | 90.99    |       |
|                                                                                                    | 32           | 97.89  | 95.38   | 97.89  | 97.89         | 97.26    |       |
|                                                                                                    | 36           | 95.38  | 90.36   | 92.87  | 95.38         | 93.50    |       |
| 28                                                                                                 | 20           | 70.28  | 60.24   | 62.75  | 65.26         | 64.63    | 87.56 |
|                                                                                                    | 24           | 82.83  | 85.34   | 82.83  | 87.85         | 84.71    |       |
|                                                                                                    | 28           | 95.38  | 92.87   | 97.89  | 95.38         | 95.38    |       |
|                                                                                                    | 32           | 97.89  | 100.00  | 97.89  | 100.00        | 98.95    |       |
|                                                                                                    | 36           | 95.38  | 92.87   | 95.38  | 92.87         | 94.13    |       |
| CA                                                                                                 | 20           | 57.73  | 55.22   | 60.24  | 60.24         | 58.36    | 84.92 |
|                                                                                                    | 24           | 82.83  | 77.81   | 80.32  | 82.83         | 80.95    |       |
|                                                                                                    | 28           | 95.38  | 87.85   | 90.36  | 92.87         | 91.62    |       |
|                                                                                                    | 32           | 100.00 | 97.89   | 100.00 | 95.38         | 98.32    |       |
|                                                                                                    | 36           | 95.38  | 92.87   | 95.38  | 97.89         | 95.38    |       |
| ORTALAMA                                                                                           |              | 88.45  | 83.65   | 87.42  | 87.36         |          |       |
| LSD      Genotip: Ö.D.      Besin Ortamı: Ö.D.      Genotip x Embriyo yaşı x Besin ortamı: 14,67** |              |        |         |        |               |          |       |

**Çizelge 4.2.** Embriyo yaşı ve ortamlara göre başarı oranları (%)

| <b>Embriyo yaşı</b> | <b>MS</b>             | <b>KİNETİN</b> | <b>IAA</b>                           | <b>KİNETİN + IAA</b> | <b>ORTALAMA</b> |
|---------------------|-----------------------|----------------|--------------------------------------|----------------------|-----------------|
| <b>20</b>           | 65.54                 | 59.40          | 63.59                                | 64.70                | <b>63.31 c</b>  |
| <b>24</b>           | 84.22                 | 78.65          | 83.95                                | 83.67                | <b>82.62 b</b>  |
| <b>28</b>           | 96.77                 | 91.20          | 95.66                                | 94.82                | <b>94.61 a</b>  |
| <b>32</b>           | 99.28                 | 95.94          | 98.73                                | 98.45                | <b>98.10 a</b>  |
| <b>36</b>           | 96.77                 | 93.15          | 95.38                                | 95.38                | <b>95.17 a</b>  |
| <b>LSD</b>          | Embriyo yaşı : 8,22** |                | Embriyo yaşı x Besin ortamı : 12,41* |                      |                 |

Denemede genotipler arasında başarı oranı % 84,92 (CA genotipi) ile % 91,12 (03 nolu genotip) arasında değişmiştir. Genotipler arasında oluşan bu farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Denemede kullanılan besin ortamları arasında ise başarı oranı % 83,65 ile MS + kinetin uygulamasında en düşük olurken, % 88,45 ile MS uygulamasında en yüksek bulunmuştur. Besin ortamları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Denemede genotip x besin ortamı interaksyonu da önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Genotiplere ve ortamlara göre başarı oranları

| <b>Genotipler</b> | <b>MS</b>    | <b>KİNETİN</b> | <b>IAA</b>   | <b>KİNETİN + IAA</b> | <b>ORTALAMA</b> |
|-------------------|--------------|----------------|--------------|----------------------|-----------------|
| <b>02</b>         | 90.20        | 82.83          | 88.35        | 89.28                | <b>87.66</b>    |
| <b>03</b>         | 91.71        | 88.77          | 92.21        | 91.79                | <b>91.12</b>    |
| <b>07</b>         | 86.85        | 83.83          | 86.34        | 85.34                | <b>85.59</b>    |
| <b>09</b>         | 88.77        | 82.33          | 88.69        | 88.27                | <b>87.02</b>    |
| <b>10</b>         | 89.28        | 82.33          | 86.85        | 87.27                | <b>86.43</b>    |
| <b>13</b>         | 88.27        | 81.83          | 85.84        | 84.84                | <b>85.19</b>    |
| <b>18</b>         | 86.34        | 82.33          | 85.84        | 85.34                | <b>84.96</b>    |
| <b>28</b>         | 88.35        | 86.26          | 87.35        | 88.27                | <b>87.56</b>    |
| <b>CA</b>         | 86.26        | 82.33          | 85.26        | 85.84                | <b>84.92</b>    |
| <b>Ortalama</b>   | <b>88.45</b> | <b>83.65</b>   | <b>87.42</b> | <b>87.36</b>         |                 |



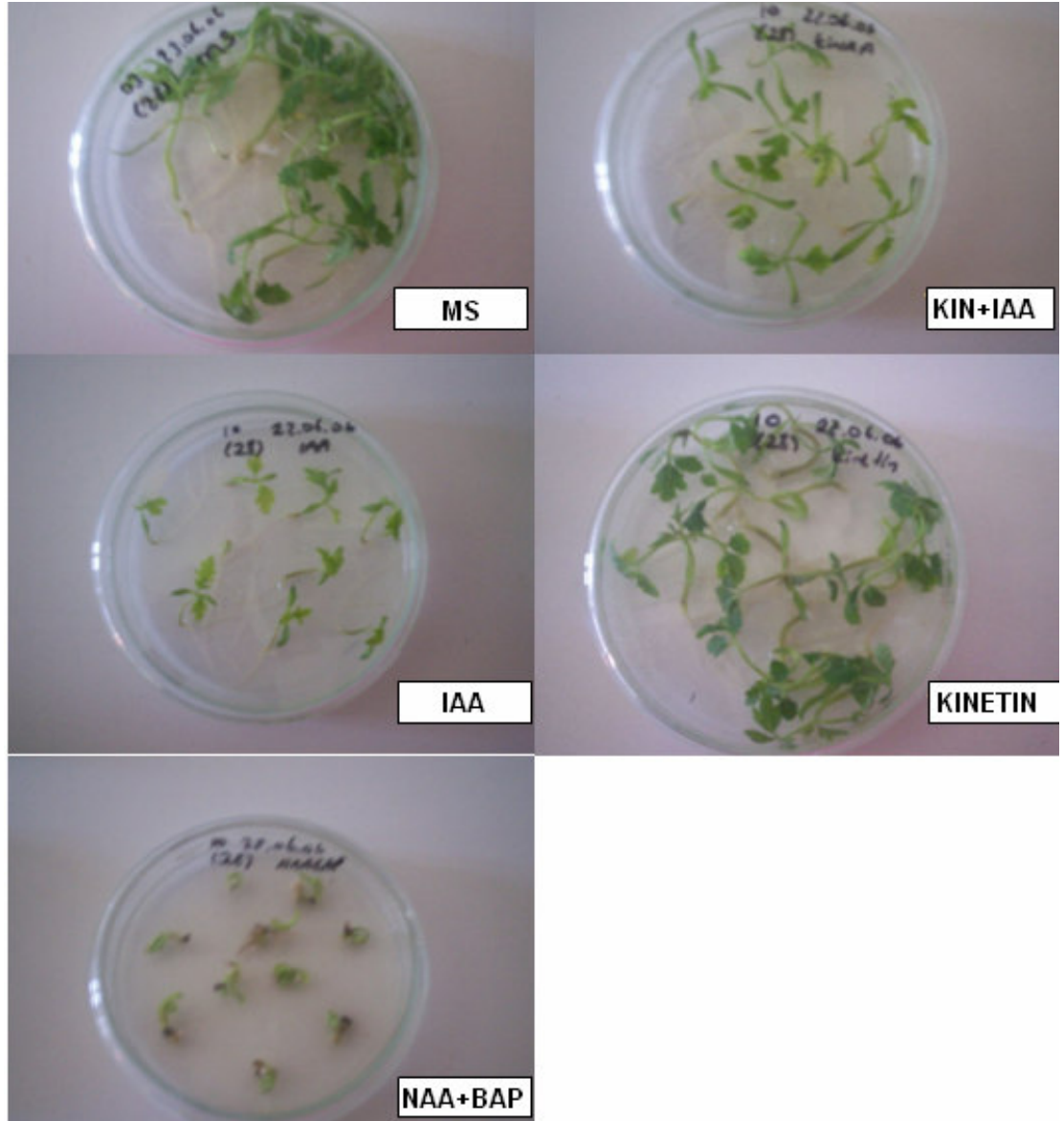
Denemede başarı oranları besin ortamlarına aktarılan embriyolardan bitki elde etme esasına göre belirlenmiştir. Şekil 4.2 ve 4.3 incelendiğinde ortamlara bağlı olarak gelişme farklılıkları görülebilmektedir. Ancak bu durum embriyoların bitkiye dönüşümünden ziyade besin ortamlarının gelişme hızı üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Besin ortamları ve genotipler arasında başarı oranı bakımından önemli bir farkın oluşmaması embriyoların her 4 ortamda da gelişebilmelerinden kaynaklanmaktadır. Denemede mekanik zarar görmeden besin ortamlarına aktarılabilen embriyoların tamamından bitki elde edilmiştir.

Denemede başarı oranı üzerine en etkili faktörün embriyo yaşı olması, embriyoların alınma dönemlerinin önemini ortaya koymaktadır. Denemede kendilemeden sonraki 28-36 günler arasında alınan embriyolarda başarı oranı en yüksek olmuştur. Aragao et. al. (2002), domateste 30 günlük embriyoların en iyi sonucu verdiğini, Young et. al. (1987), domateste embriyo kültüründe başarı oranının embriyoların yaşına bağlı olarak değiştiğini belirtmeleri denemede elde edilen sonuçları desteklemektedir.

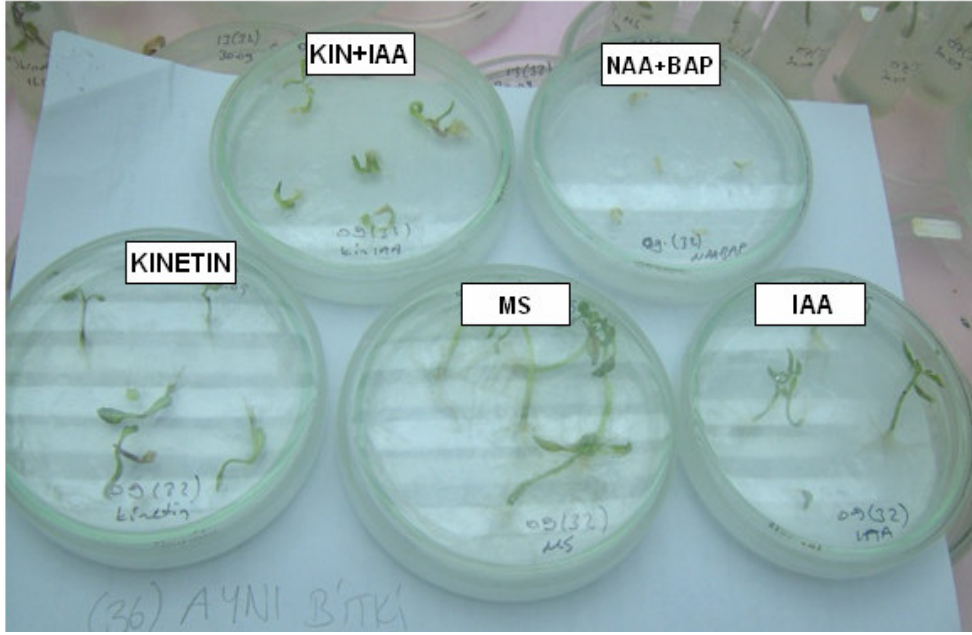
Denemede kullanılan genotipler arasında başarı oranı bakımından fark bulunamaması ve bütün genotiplerde başarı oranının yüksek olması domatesin embriyo kültürü tekniğine yatkın bir tür olmasından kaynaklanmaktadır. Gubis et al. (2003), domateste embriyo kültüründe başarı oranının % 86-100 arasında değiştiğini ve genotip farklılığının başarıya etkisinin olmadığını belirtmesi deneme sonuçlarını desteklemektedir. Benzer şekilde Plana et al. (2006), domateste embriyo kültürü tekniğinin uygulanmasında başarı oranının % 100 olduğunu, Arous et al. (2001) ise, biberde embriyo kültürü tekniği kullanılarak elde edilen bitkilerin daha sonraki devrede hayatiyetlerini devam ettirme oranının % 100 olduğunu belirtmeleri deneme sonuçları ile paralellik göstermektedir. Denemede embriyo kültürü tekniği kullanılarak elde edilen bitkilerin hayatiyetlerini devam ettirme oranı % 100 olmuştur.

MS besin ortamına ilave edilen oksin ve sitokininlerin başarı oranına önemli bir etkilerinin olmaması MS besin ortamının tek başına yeterli olmasından kaynaklanmaktadır. Bileşimine bakıldığında MS besin ortamının zengin bir içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Besin ortamlarının embriyo kültürü tekniğinde başarı üzerine etkili olduğunu ifade eden bazı araştırmacılar, çoğunlukla MS, HLH, B5 gibi içerikleri farklı ortamların etkilerinden söz

etmektedirler (Sharma et. al., 1996; Aragao et. al., 2002). Araştırmacılar genellikle somatik embriyo kültürü çalışmış ve farklı embriyo explantlarından sürgün rejenerasyonu oluşumunu incelemiştir. Bizim çalışmamızda ise embriyoların gelişmelerini devam ettirmeleri esas alındığından MS besin ortamı yeterli olmuştur.



**Şekil 4.2.** 10 nolu genotipe ait 28 günlük embriyoların ortamlara göre gelişme düzeyleri



**Şekil 4.3.** 09 nolu genotipe ait 32 günlük embriyoların farklı ortamlarda gelişme durumları

#### 4.2. Kendilemeden Çiçeklenmeye Kadar Geçen Süre

Denemede kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süreler incelendiğinde çiçeklenmesi en kısa sürede gerçekleşen uygulama 69,3 gün ile 09 nolu genotipin 20 günlük embriyoların MS besin ortamında sağlanmıştır. MS + IAA besin ortamında CA genotipinin 32 günlük embriyolarının kendilemeden çiçeklenmeye kadar gerek duydukları süre 128,6 gün ile en uzun süre olmuştur. Çiçeklenmeye kadar geçen süreler arasındaki farklılıklar genotiplere ve besin ortamlarına göre önemli çıkmamıştır. Denemede embriyo yaşı x besin ortamı x genotip interaksyonu 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.4). Denemede embriyo yaşlarına bağlı olarak çiçeklenmeye kadar geçen süreler değişmektedir. Bu süre 20 günlük embriyolarda ortalama 79,8 gün iken, 32 günlük embriyolarda 103,9 gün olmuştur. Embriyo yaşlarına bağlı olarak oluşan farklılıklar ve embriyo yaşı x besin ortamı interaksyonu 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.4.** Genotiplere, embriyo yaşına ve ortamlara göre çiçeklenmeye kadar geçen süreler (gün)

| Genotipler                                                                          | Embriyo yaşı | MS    | KİNETİN | IAA   | KİN+ IAA | ORT.  |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------|---------|-------|----------|-------|------|
| 02                                                                                  | 20           | 83.4  | 78.3    | 83.4  | 88.4     | 83.4  | 95.2 |
|                                                                                     | 24           | 80.4  | 79.3    | 80.4  | 80.4     | 80.1  |      |
|                                                                                     | 28           | 107.5 | 107.5   | 108.5 | 109.5    | 108.2 |      |
|                                                                                     | 32           | 102.5 | 102.5   | 101.5 | 102.5    | 102.2 |      |
|                                                                                     | 36           | 104.5 | 104.5   | 98.4  | 100.5    | 102.0 |      |
| 03                                                                                  | 20           | 82.4  | 82.4    | 89.4  | 84.4     | 84.6  | 92.4 |
|                                                                                     | 24           | 92.4  | 83.4    | 84.4  | 85.4     | 86.4  |      |
|                                                                                     | 28           | 87.4  | 92.4    | 95.4  | 96.4     | 92.9  |      |
|                                                                                     | 32           | 99.4  | 96.4    | 93.4  | 97.4     | 96.7  |      |
|                                                                                     | 36           | 101.5 | 100.5   | 101.5 | 102.5    | 101.5 |      |
| 07                                                                                  | 20           | 79.3  | 74.3    | 86.4  | 79.3     | 79.8  | 89.4 |
|                                                                                     | 24           | 83.4  | 85.4    | 74.3  | 75.3     | 79.6  |      |
|                                                                                     | 28           | 97.4  | 97.4    | 87.4  | 96.4     | 94.7  |      |
|                                                                                     | 32           | 99.4  | 96.4    | 93.4  | 97.4     | 96.7  |      |
|                                                                                     | 36           | 95.4  | 94.4    | 99.4  | 96.4     | 96.4  |      |
| 09                                                                                  | 20           | 69.3  | 83.4    | 81.4  | 76.3     | 77.6  | 86.2 |
|                                                                                     | 24           | 74.3  | 74.3    | 74.3  | 75.3     | 74.6  |      |
|                                                                                     | 28           | 81.4  | 81.4    | 83.4  | 83.4     | 82.4  |      |
|                                                                                     | 32           | 96.4  | 96.4    | 96.4  | 96.4     | 96.4  |      |
|                                                                                     | 36           | 100.5 | 98.4    | 99.4  | 101.5    | 99.9  |      |
| 10                                                                                  | 20           | 75.3  | 81.4    | 85.4  | 75.3     | 79.3  | 88.4 |
|                                                                                     | 24           | 81.4  | 81.4    | 76.3  | 91.4     | 82.6  |      |
|                                                                                     | 28           | 76.3  | 73.3    | 76.3  | 76.3     | 75.6  |      |
|                                                                                     | 32           | 98.4  | 100.5   | 100.5 | 95.4     | 98.7  |      |
|                                                                                     | 36           | 104.5 | 106.5   | 105.5 | 106.5    | 105.7 |      |
| 13                                                                                  | 20           | 75.3  | 77.3    | 78.3  | 99.4     | 82.6  | 98.2 |
|                                                                                     | 24           | 81.4  | 79.3    | 79.3  | 83.4     | 80.9  |      |
|                                                                                     | 28           | 97.4  | 98.4    | 98.4  | 97.4     | 97.9  |      |
|                                                                                     | 32           | 116.5 | 116.5   | 115.5 | 117.5    | 116.5 |      |
|                                                                                     | 36           | 104.5 | 119.5   | 104.5 | 123.6    | 113.0 |      |
| 18                                                                                  | 20           | 78.3  | 77.3    | 70.3  | 78.3     | 76.1  | 88.0 |
|                                                                                     | 24           | 78.3  | 77.3    | 94.4  | 99.4     | 87.4  |      |
|                                                                                     | 28           | 76.3  | 76.3    | 76.3  | 76.3     | 76.3  |      |
|                                                                                     | 32           | 99.4  | 98.4    | 98.4  | 100.5    | 99.2  |      |
|                                                                                     | 36           | 99.4  | 100.5   | 102.5 | 102.5    | 101.2 |      |
| 28                                                                                  | 20           | 75.3  | 75.3    | 76.3  | 78.3     | 76.3  | 92.9 |
|                                                                                     | 24           | 99.4  | 100.5   | 100.5 | 102.5    | 100.7 |      |
|                                                                                     | 28           | 81.4  | 81.4    | 81.4  | 81.4     | 81.4  |      |
|                                                                                     | 32           | 95.4  | 106.5   | 105.5 | 107.5    | 103.7 |      |
|                                                                                     | 36           | 101.5 | 99.4    | 100.5 | 108.5    | 102.5 |      |
| CA                                                                                  | 20           | 77.3  | 79.3    | 79.3  | 79.3     | 78.8  | 92.5 |
|                                                                                     | 24           | 74.3  | 74.3    | 74.3  | 74.3     | 74.3  |      |
|                                                                                     | 28           | 71.3  | 71.3    | 91.4  | 91.4     | 81.4  |      |
|                                                                                     | 32           | 127.6 | 126.6   | 128.6 | 120.6    | 125.8 |      |
|                                                                                     | 36           | 101.5 | 105.5   | 99.4  | 101.5    | 102.0 |      |
| ORTALAMA                                                                            |              | 90,4  | 91,0    | 91,4  | 93,2     |       |      |
| LSD Genotip: Ö.D. Besin Ortamı: Ö.D. Genotip x Embriyo yaşı x Besin ortamı: 18,27** |              |       |         |       |          |       |      |

Denemede kullanılan genotiplerin besin ortamlarına bağı olarak çiçeklenme süreleri 86,1 gün ile 98,1 gün arasında değişmektedir. Ancak besin ortamları arasındaki farklılıklar ile genotip x besin ortamı etkileşimi önemli çıkmamıştır (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.5.** Embriyo yaşı ve ortamlara göre kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre (gün)

| <b>Embriyo yaşı</b> | <b>MS</b>             | <b>KİNETİN</b> | <b>IAA</b>                           | <b>KİN + IAA</b> | <b>ORTALAMA</b> |
|---------------------|-----------------------|----------------|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| <b>20</b>           | 77.3                  | 78.7           | 81.1                                 | 82.1             | <b>79.8</b>     |
| <b>24</b>           | 82.8                  | 81.6           | 82.0                                 | 85.2             | <b>82.9</b>     |
| <b>28</b>           | 86.2                  | 86.6           | 88.7                                 | 89.8             | <b>87.8</b>     |
| <b>32</b>           | 103.8                 | 104.4          | 103.6                                | 103.9            | <b>103.9</b>    |
| <b>36</b>           | 101.4                 | 103.2          | 101.2                                | 104.8            | <b>102.6</b>    |
| <b>LSD</b>          | Embriyo yaşı : 13,91* |                | Embriyo yaşı x Besin ortamı : 18,26* |                  |                 |

**Çizelge 4.6.** Genotiplere ve ortamlara göre kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre (gün)

| <b>Genotipler</b> | <b>MS</b>   | <b>KİNETİN</b> | <b>IAA</b>  | <b>KİN + IAA</b> | <b>ORTALAMA</b> |
|-------------------|-------------|----------------|-------------|------------------|-----------------|
| <b>02</b>         | 95.6        | 94.4           | 94.4        | 96.2             | <b>95.2</b>     |
| <b>03</b>         | 92.6        | 91.0           | 92.8        | 93.2             | <b>92.4</b>     |
| <b>07</b>         | 90.9        | 89.5           | 88.1        | 88.9             | <b>89.4</b>     |
| <b>09</b>         | 84.3        | 86.7           | 86.9        | 86.5             | <b>86.2</b>     |
| <b>10</b>         | 87.1        | 88.6           | 88.8        | 88.9             | <b>88.4</b>     |
| <b>13</b>         | 95.0        | 98.2           | 95.2        | 104.2            | <b>98.2</b>     |
| <b>18</b>         | 86.3        | 85.9           | 88.3        | 91.4             | <b>88.0</b>     |
| <b>28</b>         | 90.0        | 92.6           | 92.8        | 95.6             | <b>92.9</b>     |
| <b>CA</b>         | 90.4        | 91.4           | 94.6        | 93.4             | <b>92.5</b>     |
| <b>Ortalama</b>   | <b>90.4</b> | <b>91.0</b>    | <b>91.4</b> | <b>93.2</b>      |                 |

Çalışmada kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süreler üzerine genotiplerin ve besin ortamlarının önemli bir etkisi olmazken, embriyo yaşlarına bağlı olarak bu sürelerin değiştiği görülmektedir. Denemede genel olarak embriyo yaşı küçüldükçe kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen sürenin de kısaldığı görülmektedir.

**Çizelge 4.7.** Genotiplere ait kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süreler (gün)

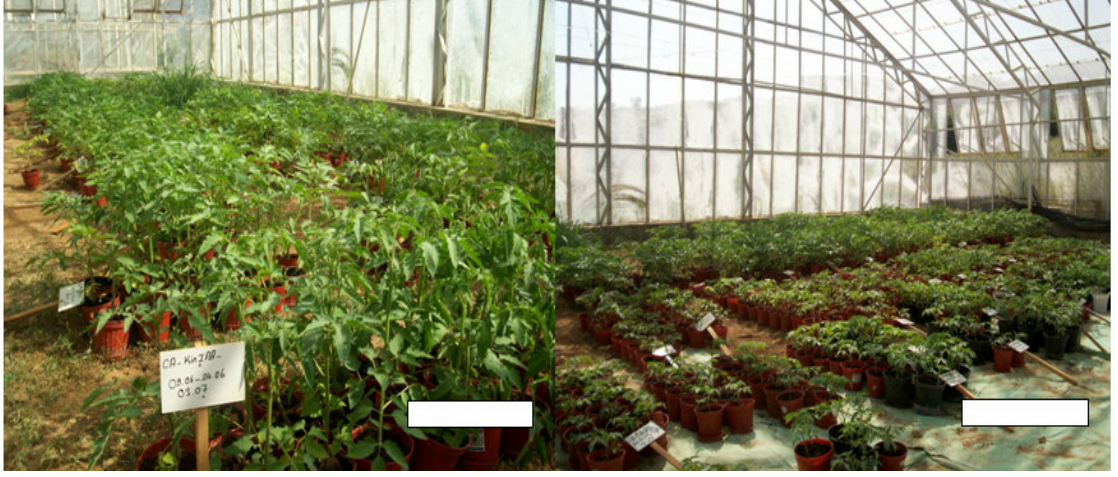
| <b>Genotipler</b> | <b>Kendilemeden tohum hasadına kadar geçen süre</b> | <b>Tohumdan çiçeklenmeye Kadar geçen süre</b> | <b>Kendilemeden çiçeklenmeye kadar geçen süre</b> |
|-------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>02</b>         | 57                                                  | 61                                            | 118                                               |
| <b>03</b>         | 59                                                  | 60                                            | 119                                               |
| <b>07</b>         | 62                                                  | 61                                            | 123                                               |
| <b>09</b>         | 64                                                  | 62                                            | 126                                               |
| <b>10</b>         | 65                                                  | 60                                            | 125                                               |
| <b>13</b>         | 67                                                  | 65                                            | 132                                               |
| <b>18</b>         | 61                                                  | 57                                            | 118                                               |
| <b>28</b>         | 62                                                  | 61                                            | 123                                               |
| <b>CA</b>         | 63                                                  | 58                                            | 121                                               |

İslah süresinin kısılmasına embriyo kültürünün etkisi incelendiğinde kontrol uygulamasına göre embriyo kültürü uygulamasının genotiplere bağlı olarak ortalama 22,9 gün ile 39,9 gün arasında süreyi kısalttığı görülmektedir. Denemede embriyo yaşları ve besin ortamları da dikkate alınmak kaydıyla, embriyo kültürü uygulamalarında çiçeklenmeye kadar geçen en kısa süreler esas alındığında zamandan kazanılan sürenin genotiplere göre 36,6 gün ile 56,7 gün arasında değiştiği görülmektedir. Domates ıslah çalışmalarında 1 vejetasyonun veya ıslah generasyonunun minimum 4-5 ay sürdüğü düşünüldüğünde bu sürede 1,5-2 aylık bir kısalma önemli avantajlar sağlayacaktır. Doku kültürü teknikleri içinde embriyo kültürü tekniğinin başta seleksiyon için gereken zaman olmak üzere ıslah süresini kısalttığını belirten Ellialtıoğlu ve Abak (1986), Altman (1999),

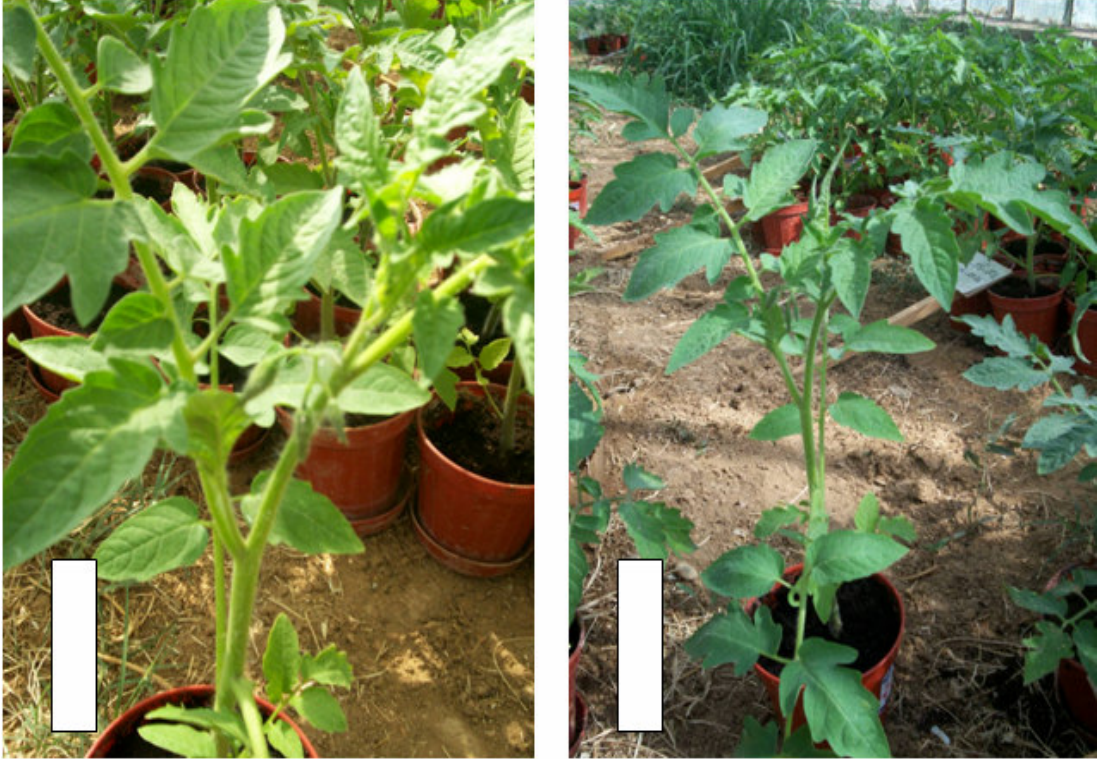
Assoumou Ndong et al. (2002), Wu et al. (2003) ve Cravero and Cointry (2007)'nin ulaştıkları sonuçlar deneme sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Denemede embriyolardan bitki elde etmedeki başarı oranı bakımından 28-32 günlük embriyolar en iyi sonucu verirken, çiçeklenmeye kadar geçen süre bakımından 20-28 günlük embriyolar daha etkili olmuştur. Yürütülecek çalışmalarda amaç daha fazla bitki elde etmek ise bu durumda 28-36 günlük embriyolar tercih edilmelidir. Islah süresinin kısaltılması amaçlanıyorsa bu durumda 20-28 günlük embriyoların tercih edilmesi daha doğru olacaktır. Başarı oranları ve zamandan tasarruf birlikte dikkate alındığında çalışmamızda 28 günlük embriyoların kültüre alınması için en ideal devre olduğu sonucuna varılmıştır.





Şekil 4.4. Çiçeklenme dönemine gelmiş bitkilerin genel görünümü



Şekil 4.5. Çiçeklenme sonrası bitkilerde gelişme durumları





Şekil 4.6. Çiçeklenme döneminde gözlem yapılan bitkiler

**KAYNAKLAR**

- AGRAWAL, S., CHANDRA, N., KOTHARI, S.L. 1989.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 16(1): 47–55.
- ALTMAN, A. 1999.** Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. Plant Biotechnology, 2(2).
- ANONYMOUS, 2005.** Tomatoes production in World. FAO statistics. FAO home page.
- ARAGAO, F.A.S., RIBEIRO, C.S.C., CASALI, V.W.D., GIORDANO, L.B., 2002.** Tomato embryo culture for introgression of genes of *Lycopersicon peruvianum* in *L. esculentum* Hort. Bras. vol.20 no.4
- AROUS, S., BOUSSAID, M., MARRAKCHI, M., 2001.** Plant regeneration from zygotik embryo hypocotyls of Tunusian chili (*Capsicum annum* L.). J. Appl. Hort., 3(1): 17–22.
- ASSOUMOU NDONG, Y., RANCILLAC, M., PERNEY, P. 2002.** New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumes. Plant Breeding Volume 121 Issue 5 Page 436-440
- BAJAJ, Y.P.S., KUMAR, P., LABANA, K.S., 1982.** Interspecific Hybridization in the genus *Arachis* Through embryo culture. Euphytica, 31: 365–370.
- BAJAJ, Y.P.S., 1990.** Wide hybridization in Legumes and Oilseed Crops Through embryo, ovule and ovary culture. In Biotechnology in Agriculture and Forestry 10. Legumes and oilseed Crops. Springer Verlag, Berlin. pp:3–37.
- BAUCHAN, G.R., 1987.** Embryo culture of *Medicago scutellata* and *M. sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10(1): 21–29.
- BEHARAV, A., COHEN, Y. 1995.** Effect of kinetin and GA3 on in vitro ovule embryo culture of *Cucumis melo* (L.). Plant Growth Regulation 16(3): 267–269.
- BHATIA, P., ASHWATH, N., SENARATNA, TISSA, MIDMORE, D., 2004.** Tissue culture studies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 1–21.

- BIGGS, B.J., SMITH, M.K., SCOTT, K.J., 1986.** The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* crantz) seeds. *Plant cell, Tissue and Organ culture*. 6: 229–234.
- BOJNAUTH,G., PUCHOOA, S., BAHORUN, T., 2003.** *In Vitro* Regeneration of *Asparagus Officinalis*: Preliminary Results. Food and Agricultural Research Council.Mauritius, 15 P.
- BURBULIS, N., KUPRINE, R. 2005.** Induction of somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of Spring Brassica napus. *Acta Universitatis Latviensis*, 691: 137–143.
- BÜRÜN, B., GÜREL, A., 2001.** Bitki Biyoteknolojisi –1- Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları. 1-23, 221, 251.
- BÜRÜN, B., POYRAZOĞLU, E.Ç., 2002.** Embryo culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.) *Turk. J. Biol.*, 26: 175–180.
- CHRISTOPHER, T., RAJAM, M.V. 1996.** Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red repper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46(3): 245–250.
- CHOI, P.S., CHO, D.Y., SOH, W.Y., 2003.** Plant regeneration from immature embryo cultures of *Vigna unguiculata* *Biologia plantarum* 47(2): 305–308.
- CRAVERO, V., COINTRY, E., 2007.** Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. *Plant Breeding*, 126(2): 222–224.
- DEMIREL, F., SENİZ., V., 1997.** A Research on the utilization pozzibilities of embryo culture in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Hort. (ISHS)* 447: 273–238.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, O., GÜRBÜZ, F., 1983.** İstatistiki Metotlar I. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 861. Ders Kitabı: 229. Ankara.
- EBRAHIMIE, E., HABASHI, A.A., GHAREYAZIE, B., GHANNADHA, M., MOHAMMADIE, M. 2003.** A rapid and efficient method for regeneation of

plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 19–25.

**EBRAHIME, E., HABASHI, A.A., MOHAMMADIE – DEHCESHMEH, M., GHANNADHA, M.R., GHAREYAZIE, B., YAZDI – AMADI, B. 2006.** Direct shoot receneration from mature embryo as a rapid and genotype – independent pathway in Tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 42(5): 455–460.

**ELLİALTIOĞLU, Ş., ABAK, K. 1986.** Domates Islahında Embriyo Kültüründen Yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu. 15-17 Ekim 1986, İzmir, s:42-52.

**EMERSHAD, R. L., RAMMING, D. W. 1984.** In-ovulo Embryo Culture of *Vitis vinifera* L. C.V. 'Thompson Seedless'. *American Journal of Botany*, **71(6): 873-877**.

**EVANS, D.A. 1989.** Soma Clonal variation genetic basis and breeding applications. *Trends Genetics* 5: 46–50.

**GÖNÜLŞEN, N. 1987.** Bitki Doku Kültürleri, Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No: 78, 140 s.

**GUBIS, J., LAJCHOVA, Z., FARAGO, J., JUREKOVA, Z. 2003.** Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro . *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39(1): 9–14.

**HATİPOĞLU, R., 2002.** Bitki Biyoteknolojisi. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190 Ders Kitapları Yayın No: A-58

**HO, R.H., 1987.** Embriyo culture. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. 2: 137–167.

**HOBSON G., DAVIES J. 1971.** The Tomato, The Bio chemistry of Fruits and Their products. 337–482. Academic Pres, New York.

**HOGENBOOM, N.G., 1972.** Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. *Euphytica*. 21(2): 221–227.

- HOSSAIN, M.A., NEMATO, K., MINAMI, M., 2003.** Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annum* L. and *C. Frutescens* L. via embryo rescue. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 47(1): 9–16.
- KASHA, K. J., KAO, K. N., 1970.** High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L). *Nature* 225: 874-876.
- LAZERI, P.A., HILDEBRAND, D.F., COLLINS, G.B. 1987.** Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and organ Culture*. 10(3): 197–208.
- MINNEO, L., 1990.** Plant Tissue Culture Technigues. *Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biyology Laboratory Education*, 151–174.
- MONNIER, M., 1990.** Zygotic Embryo Culture. In: Bhojwani SS (ed), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, pp. 366-393, The Netherlands.
- MUKHERJEE, A., UNNIKRISHNAN, M., NAIR, N.G. 1991.** Growth and morphogenesis of immature embryos of sweet potato (*I pomea batatas* L.) in vitro . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 26(2): 97–99.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*. 15: 473-497.
- NEAL, C.A.; TOPOLESKI, L.D. 1983.** Hormonal regulation of growth and development of tomato embryos in vitro . *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 869-873.
- NOLAN, K. E., ROSE, R.J., 1998.** Plant Regeneration from Cultured *Medicago truncatula* with Particular Reference to Absciscic Acid and Light Treatments. *Australian Journal of Botany* 46(1) 151 - 160
- NOVAK , F.J., MOSKOVA, I. 1979.** Apical shoot tip culture of tomato. *Sci. Hort*. 10: 337–344.

- ODUTAYO, O.I., AKINRIMISI, F.B., OGUNBOSOYE, I. OSO, R.T., 2005.** Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (11), pp.
- PEARSON, O.H., 1983.** Heterosis in Vegetable Crops. Reappraisal of Theory and Practice. Heterosis. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 6. Ed. By R.Frankel. P.138-188. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- PIERIK, R. L. M. 1989.** In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers Group. Dordrecht, Netherlands, pp. 139-149.
- PLANA, D., FUENTES, A., ALUAREZ, M., LARA, R.M., ALUAREZ, F., PUJOT, M. 2006.** A new approach for in vitro regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. Biotechnol. J. 1: 1153–1157.
- RAGHAVAN, V., 2003.** One hundred years of zygotic embryo culture investigations. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 39: 437–442.
- RAHMAN, M.M., KAUL, K. 1989.** Differentiation of sodium chloride tolerant cell lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Jet Star J.Plant Physiology 133: 710–712.
- RAO, A., AGARWAL, S. 2000.** Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J. Am. College Nutr. 19: 563-569.
- REDDY, B. V. P., SARADHI, P. P., SHARMILA, P. 2005.** Efficient somatic embryogenesis from root segments of *Sesbania sesban* by finetuning the levels of auxin and cytokinin. Physiology and Molecular Biology of Plants, 11(1): 121-126
- SANTAREM, E.R., PELISSIER, B, FINER, J.J., 1997.** Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In vitro Cell. Dev. Biol.–Plant 33: 13–19.
- SCHRYER, P.A., LU, Q., VANDENBERG, A, BETT, K.E. 2005.** Rapid regeneration of *Phaseolus angustissimus* and *P. Vulgaris* from very young zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 67–74.

- SEVGİCAN, A., 2002.** Örtüaltı Sebzeciliği Cilt I (Topraklı Tarım).Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. No:528. ISBN: 975-483-384-2. E.Ü. Baimevi.
- SLESÁK, H., PRZYWARA, L. 2003.** The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos in vitro *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 45(2): 183–190.
- SHARMA, D.R., KAVR, R., KUMAR, K., 1996.** Embryo rescue in plants a review *Euphytica*. 89(3): 325–337.
- STAVAREK, S.J. RAINS, D.W. 1984.** The development of tolerance to mineral stress. *Hortscience* 119: 377–382.
- TIVARI, S., TRIPATHI, M.K., KHARE, U.K., RANA, R. 2007.** Initiation of embryogenic suspension culture and plant regeneration in onion (*Allium cepa* L). *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 107–113.
- THOMAS, R.R., PRATT, D. 1981.** Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 59(4): 215–219.
- TOYODA, H., SHIMIZU, K., CHATANI, K., KITA, N., MATSUDA, Y., OUCHI, S. 1989.** Selection of bacterial wilt resistant tomato through tissue culture. *Plant cell Rep.* 8: 317–320.
- TURGUT, K., BARGHCHI, M., SCOTT, R., 1998.** Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 117 (5), 503–504.
- UYSAL, H., SEYİS, F., KURT, O., 2007.** Tarla bitkilerinde melezleme bariyerlerinin aşılmasında alternatif bir yöntem: Embriyo kültürü. *OMU Zir. Fak. Dergisi*, 22(1): 116–122
- VELTCHEVA, M., SVETLEVA, D., PETKOVA, S., PERL, A., 2005.** In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) – Problems and Progress *scientia Horticulturae* 107: 2–10.

- VURAL, H., EŞİYOK, D., DUMAN, İ. 2000.** Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. 440 s. İzmir.
- WIJBRANDI, J., CAPELLE, W., HANHART, C.J., MARTINET-SCHURINGA, E.P.L., KOORNNEEF, M. 1990.** Selection and characterization of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. Plant Sci. 70: 197-208.
- WU, M. C., YUAN, M. S., SHIL, C. T. 2003.** Shortening breeding cycles of spider lilies (*Lycoris* spp.) through embryo culture and dikaryotype hybridization between *Lycoris aurea* and "A" karyotype species. Acta Horticulturae, 620, 345-352
- YOUNG, R., KAUL, V., WILLIAMS, A. G., 1987.** Clonal Propagation in vitro from immature embryos and flower buds of *Lycopersicon peruvianum* and *L. esculentum*. Plant Science. 52(3): 237–242.
- ZAGORSKA, N.K., SHTEREVA, A., DIMITROV, B.D., KRULEVA, M.M. 1998.** Induced androgenesis (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Influence of genotype on androgenetic ability. Plant Cell Rep. 17: 968–973.
- ZAPATA, F.J. 1980.** Different regeneration potentials of mesophyll protoplasts from cultivated and wild species of tomato. Planta 148: 89–96.
- ZHANG, G.Q., ZHOU, W.J., GU, H.H., SONG, W.J., MOMOH, E.J.J. 2003.** Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture. Journal of Agronomy and Crop Science. 189(5): 347–350.



**ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Elmalı'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Elmalı'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nü 2004 yılında bitirdi. 2004 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladı.