

***İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA ÇİLEKTE
(FRAGARIA X ANANASA) REJENERASYON
ÜZERİNE FARKLI UYGULAMALARIN ETKİSİ***

Muhammet Recai TAŞTEPE

**Yüksek Lisans Tezi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN
2011
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA ÇİLEKTE (FRAGARIA X
ANANASA) REJENERASYON ÜZERİNE FARKLI
UYGULAMALARIN ETKİSİ***

Muhammet Recai TAŞTEPE

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA ÇİLEKTE (FRAGARIA X ANANASA)
REJENERASYON ÜZERİNE FARKLI UYGULAMALARIN ETKİSİ**

Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN danışmanlığında, Muhammet Recai TAŞTEPE tarafından hazırlanan bu çalışma 16/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza :

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA ÇİLEKTE (FRAGARIA X ANANASA) REJENERASYON ÜZERİNE FARKLI UYGULAMALARIN ETKİSİ

Muhammet Recai TAŞTEPE

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

Bu çalışma, 2010 ve 2011 yıllarında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülmüştür. Denemede Fern çilek çeşidi materyal olarak kullanılmıştır.

Çilekte *in vitro* şartlarda farklı uygulamaların kallus oluşumu ve rejenerasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, çilek bitkisinin farklı eksplantları (yaprak ve yaprak sapı) MS gıda ortamına farklı dozlarda ilave edilen 2,4-D'nin kallus oluşumuna ve rejenerasyon aşamasında ise kullanılan eksplant tiplerinin, kallus oluşum aşamasında ortama ilave edilen 2,4-D'nin ve rejenerasyon aşamasında ortama ilave edilen TDZ'nin sürgün oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında en yüksek kallus oluşumu 1.0 mg/l olan 2,4-D uygulamalarında bulunmuştur. Rejenerasyon aşamasında ise, sadece yaprak sapı eksplantlarından 0.5 ve 1.0 mg/l 2,4-D ortamında meydana gelmiş kallusların 1.0 mg/l TDZ ortamına aktarılanlarında sürgün meydana geldiği belirlenmiştir.

2011, 38 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çilek, Fern, 2,4-D, TDZ, Rejenerasyon, *İN vitro*,

ABSTRACT

Master Thesis

AFFECT OF DIFFERENT APPLICATIONS ON REGENERATION OF STRAWBERRY (FRAGARIA X ANANASA) UNDER IN VITRO CONDITIONS

Muhammet Recai TAŞTEPE

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

This study was carried out in Atatürk university Faculty of Agriculture Department of Horticulture between 2010 and 2011. Fern strawberry varieties in the experiment were used as material

Effects on callus formation and regeneration of different applications under in vitro conditions in strawberry were investigated. It was investigated that effects to callus formation of 2,4-D which added different doses to MS medium for different explants (leaf and petiole) of strawberry and effects on shoot formation of explant types in the stage of regeneration, 2,4-D which added in the stage of callus formation, TDZ which added in the stage of regeneration.

The highest callus formation at leaf and petiole explants was observed to the 1 mg/l, 2,4-D applications. In the stage of regeneration, calluses which added to 1.0 mg/l TDZ that occurred from petiole explants in 0.5 and 1.0 mg/l 2,4-D medium have formed shoot.

2011, 38 Pages

Keywords: Strawberry, Fern, 2,4-D, TDZ, Regeneration, *In vitro*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Doku Kültürü laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN'e, Sayın Dr. Murat AYDIN'a, Sayın Arş. Gör. Hilal E. YILDIZ'a ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü elemanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Salim ÇERİĞ'e, Sayın Arş. Gör. Muhammet H. SELVİ'ye, Sayın Biyolog M. Emin ÇÖĞENDER'e, Sayın Biyolog Mesud M. ÇİFTÇİ'ye, Sayın Ziraat Mühendisi Naci KURUKOL'a ve aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Muhammet Recai TAŞTEPE

Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Bitki Materyali	16
3.1.1. Materyal	16
3.1.2. Kimyasallar	16
3.1.2.a. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar	16
3.1.1.b. Kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar	16
3.1.2.c. Çalışmada kullanılan jel yapıcı maddeler	17
3.1.2.d. Çalışmada kullanılan oksin ve sitokin tipleri	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Sterilizasyon teknikleri	19
3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu	19
3.2.1.b. Yaprak, yaprak sapı ve yan sürgünlerin yüzey sterilizasyonu	19
3.2.1.c. Besin ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerin sterilizasyonu	19
3.2.1.d. Sterilizasyonda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	19
3.2.2. Kallus oluşumu ortamı	20
3.2.2.a. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı	20
3.2.3. Bitki rejenerasyon ortamı	21
3.2.3.a. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı	21
3.2.4. Araştırmada incelenen konular	21
3.2.5. Verilerin istatistik analizi	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	24

4.1. Kallus Oluşum Aşaması.....	24
4.1.1. Eksplant tipinin ve 2,4-D uygulamaların kallus oluşum oranına (KO) etkisi .	24
4.1.2. Eksplant tipi ve 2,4-D dozlarının eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına (ESEKO) etkisi	24
4.1.3. Eksplant tipi ve 2,4-D dozlarının kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına (KSEKO) etkisi.....	27
4.1.4. Farklı eksplant tiplerinin ve oksinin(2,4-D) kök oluşumuna etkileri(KoO)....	29
4.2. Rejenerasyon Aşaması	30
4.2.1. Eksplant tipinin ve uygulamaların sürgün oluşumuna etkileri	30
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BA	Benzyladenin
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
kPa	Kilopaskal
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre (10^{-3})
mM	Milimolar
MS	Murashige Skoog
SÇKM	Suda çözüner kuru madde miktarı
TDZ	Thidiazuron
μ l	Mikrolitre (10^{-6})
μ M	Mikromolar
2,4-D	Diklorofenoksi Asetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Farklı uygulamaların kallus oluşumuna etkisi.....	25
Şekil 4.2. Farklı uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi	27
Şekil 4.3. Farklı uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi	28
Şekil 4.4. Farklı uygulamaların kök oluşumuna etkisi	30
Şekil 4.5. Rejenerasyon ortamında oluşan sürgünlerin görünümü.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya çilek üretimi.....	2
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çilek çeşidi.....	16
Çizelge 3.2. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	17
Çizelge 3.3. Oksin ve sitokinin stok çözetilerinin hazırlanışı.....	20
Çizelge 4.1. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidi bitkisinin kallus oluşum oranı üzerine etkisi.....	25
Çizelge 4.2. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum üzerine etkisi.....	26
Çizelge 4.3. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi.....	28
Çizelge 4.4. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde kök oluşumuna etkisi	29
Çizelge 4.5. Rejenerasyon kültür ortamında eksplant tipi ve hormon dozlarına göre sürgün oluşum oranları.....	31

1. GİRİŞ

Türkiye, dünya üzerinde uygun iklim kuşağındaki konumu ve uygun toprak şartları itibariyle bahçe bitkileri yetiştiriciliği açısından birçok ekolojik avantaja sahiptir. Dünyada mevcut gen merkezleri arasında hem Yakınoğu hem de Akdeniz havzası içinde yer alan Türkiye, birçok tür ve çeşidin gen merkezi durumundadır. Öyle ki; bugün dünya üzerinde kültürü yapılan 150'ye yakın meyve türünden yaklaşık 100'e yakını ülkemizde yetiştirilebilmektedir. Bu türlerden biride çilektir.

Kültür çilekleri *F.virginia Duch.* ve *F.chiloensis (L) Duch.(Fragariaxananassa)* türlerinin hibritlenmesi sonucu oluşmuşlardır. Çilek, *Rosales* takımından, *Rosaceae* familyasında, *Fragaria* cinsinin içerdiği türlere ve yenilebilir meyvelerine denir. *F.virginia* ve *F.chiloensis* çilek türlerinin çiçekleri erkek, dişi ve erselik olmak üzere üç farklı şekilde görülebilmektedir. Çilek'te çiçek kurulumunun yenilenmesine, birincil çiçekler tarafından son verilir, son verildikten sonra iki sekonder, dört tersiyer ve sekiz adet kuarter çiçek meydana gelir. Çiçeklerin oluşumunda 10 çanak yaprak (sepal), 5 taç yaprak (petal), 20-30 tane erkek organ (stamen) ve 60-600 dişi organ (pistil) bulunur (Hancock 1999).

Anayurdu Kuzey ve Güney Amerika'dır. ABD, Avrupa, Güney ve Doğu Afrika ülkeleri, Yeni Zelanda, Avustralya ve Japonya en çok çilek yetiştiren ülkelerdir. Dünyada ki toplam çilek üretimi 4.178.152 ton dur (Çizelge 1.1).

Dünya genelinde en fazla çilek üreten ülke Amerika'dır (Çizelge 1.1). Türkiye dünya çilek üretiminde ABD'nin ardından 291.996 ton ile 2. sırada, İspanya ise 3.sırada yer almaktadır.

Türkiye değişik iklim ve toprak karakterleri yönünden çilek yetiştiriciliğinde önemli bir potansiyele sahiptir. Bahçe ürünleri arasında, ilk yıldan itibaren verime başlaması, birim alandan yüksek gelir sağlaması gibi özellikleri ile popüler olmuş, yakın bir geçmişe

kadar sadece İstanbul, Bursa, Karadeniz Ereğlisi yörelerinde yetiştirilen çilek günümüzde giderek yaygınlaşmıştır.

Çizelge 1.1. Dünya çilek üretimi(ton)(FAO 2011)

Sıra No	Ülkeler	2005	2006	2007	2008	2009
1	ABD	1.053.242	1.090.436	1.115.000	1.148.504	1.270.690
2	RUSYA	221.000	235.000	324.000	145.000	158.000
3	İSPANYA	320.853	333.500	263.900	267.500	263.700
4	TÜRKİYE	200.000	211.127	239.076	261.078	291.996
5	KORE CUM.	201.995	205.307	200.000	203.227	205.000
6	JAPONYA	196.200	190.600	193.000	190.700	184.700
7	POLONYA	184.627	193.666	168.200	200.723	198.907
8	MEKSİKA	162.627	154.893	160.000	207.485	233.041
9	ALMANYA	146.500	173.230	153.000	150.854	158.563
10	MISIR	100.000	105.000	104.000	200.254	200.000
Diğerleri		1.002.657	1.016.219	902.813	1.118.412	1.013.555
Toplam		3.789.701	3.908.978	3.822.989	4.093.737	4.178.152

Yakın veya uzak akraba türler arasında, doğal ve yapay melezlemeler, çeşit ve klonlarda doğal ya da yapay mutasyonlar sonucu ortaya çıkan genetik değişimlerin seleksiyonlar ile değerlendirilmesi meyve ıslahında yüz yıllardır uygulanmaktadır. Bununla birlikte uyumsuzluk, kısırlık, genetik açılım, uzun gençlik kısırlığı periyodu, çoğaltım ve özel kültürel uygulamalar gibi meyve türlerine özgü birçok biyolojik, fizyolojik ve yetiştiricilik sorunları geleneksel yöntemler ile ıslahta süreyi uzatmakta ya da çoğu zaman başarıyı olanaksız kılmaktadır. Buna karşılık özellikle 20. yüzyılın sonlarından itibaren biyoteknoloji alanında kaydedilen hızlı gelişmeler klasik ıslah kapsamında ele alınan bu yöntemlerin etkinliğini arttırmanın yanında başarıyı engelleyen sorunlara karşı çözümler sunmaktadır. Böylece meyve türlerinin karakterizasyonu genom analizleri ile yapılabilmekte, kalıtsal yapıları gen aktarımı, somaklonal varyasyon ve somatik hibridizasyon gibi *in vitro* teknikler ile taksonomik bir sınırlama olmaksızın hızlı ve etkili bir şekilde değiştirilebilmektedir. Bunun yanı sıra hızlı, yoğun ve virüslerden arı çoğaltım, gen kaynaklarının korunması, homozigotluğun çok kısa sürede sağlanması,

melezlerin embriyo kültürü ile yaşatılması ve birçok etkene karşı genotiplerin reaksiyonlarının kısa sürede test edilmesi sağlanabilmektedir (Litz and Gray 1992; Hatipoğlu 1999). Nitekim hızlı ve geniş çaplı üretim için *in vitro* teknikler birçok meyve türünün çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Bajaj 1986).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku veya organ (apikal meristem, kök vb) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik farklılıklar (varyabilite) oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd 2002).

Doku kültüründe özellikle meristem kültürü yöntemiyle ve alt kültür işlemleri sonucu gençleştirme sağlanabilmekte, bu da doku kültürünün önemli bir yararı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp bazı değişikliklere sebep olarak sürgün veya kök taslağı diye adlandırılan tek kutuplu ve vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine organogenesis denir (Gürel 2001).

Organogenezde bitki parçalarından ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt) yahutta önce organize olmamış bir hücreler yığını olan kallus ve daha sonra bu kallustan sürgün veya kök (indirekt) meydana gelir. Bitki parçalarından organ gelişimi direk olarak değil de önce “embriyoid” adı verilen embriyo benzeri yapıların daha sonra bu embriyolardan kök ve sürgün gelişiminin meydana gelmesi ise embriyogenesis olarak adlandırılır. Embriyogenesis; bireysel bitkilerin hücrelerinden gelişen somatik embriyogenesis ve döllenmiş bir zigottan gelişen gametik (zigotik) embriyogenesis şeklinde sınıflandırılabilir. Somatik embriyogenesis, bağımsız vasküler sistemi olan ve

kök ile sürgün aksini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasına yol açan bir süreçtir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar da somatik embriyo olarak adlandırılır. Bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururlar. Döllenen yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da “globular”, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum safhalarını geçirirler. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskular bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong *et al.* 1993).

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından (eksplant) yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir (Babaoğlu vd 2002). Bitki rejenerasyonu kotiledon, embriyo, hipokotil, gövde, yaprak, sürgün ucu, kök, genç tomurcuklar, çiçek taç yapraklar, yumurta dokusu, yumurta hücreleri, yaprak sapı vs. eksplantlardan yapılabilmektedir. Olgun ve olgun olmayan organlardan doğrudan eksplant alınarak rejenerasyon yapılabilir. Sürgün rejenerasyonu sistemi transgenik bitkilerin geliştirilmesinde, bitki hücrelerine genin aktarılmasında ve somoklonal varyasyonların belirlenmesinde ve teşvikinde kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonu yani bitkinin hücre, doku ve organlarının klonlanmasıdır. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibarıyla üç kısımda incelenebilir:

- 1) Organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon,
- 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon,
- 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon.

Birinci tipte uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla çoğaltım denilir. Elde edilen hücreler tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve

sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonrada bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus, proto- kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonrada ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon). Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici (epigenetik) varyasyonlar oluşabilir. Son olarak normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir. Bu bitkicik, doku ve hücrelerde kromozom katlaması yoluyla fertil (dihaploid veya katlanmış haploid) bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu vd 2001).

Çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilmiş kültür ortamları bu amaçla kullanılabilir. Ancak makro ve mikro elementlerin dengeli bir şekilde bulunduğu temel ortamlara vitamin, karbon kaynağı, organik büyüme faktörleri (amino asitler, üre ve peptonlar), bitki hormonları gibi çeşitli maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir. Gıda ortamında karbonhidratların bulunmaması durumunda, kallus dokuları iyi bir şekilde gelişemezler. Genellikle sakaroz, bazen de glikoz etkili olmaktadır.

In vitro besi ortamına ilave edilen büyümeyi düzenleyiciler (2,4-D, IBA, IAA, Kinetin, BAP,...vb.) gelişmeyi önemli ölçüde etkilemektedir. Genel olarak doku kültürü ile üretim çalışmalarında besin ortamlarında kullanılan büyümeyi düzenleyiciler arasında farklı sonuçlar alınmaktadır. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler (Babaoğlu vd 2001). BAP sitokininler içinde en çok kullanılanıdır. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engeller(Smith 1992). Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun

uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesi ve adventif kök oluşumunu engellerler (Babaoğlu vd 2001).

Kallus kültüründe yüksek bir gelişme derecesinin sağlanması için, gıda ortamında oksin ve stokininlerin bulunması gerekmektedir. Oksin olarak çoğunlukla, IAA ve daha stabil sentetik bileşikler olarak NAA ve 2,4-D kullanılmaktadır. Kullanılması gereken konsantrasyon, oksinin tipine ve kallusun orjinine göre değişmekle beraber, genelde 0.01-15.0 mg/l arası uygun olmaktadır. En çok kullanılan sitokinler ise kinetin ve benziladenindir. Bazı bitkilerin doku kültürlerinde yapılan devamlı alt kültürleri sonucunda, kültür şartlarındaki isteklerinde değişiklikler olabilmektedir. Örneğin, başlangıçta kültür ortamına dışarıdan oksin ilavesi gerekirken, sonradan yapılan alt kültürlerde buna gerek duyulmamaktadır. Çünkü hücre bölünmesi ve kallus oluşumunun uyarılması endogen ve ekzogen büyüme maddelerinin kompleks interaksyonu sonucu sağlanabilmektedir. Kallus kültüründe hormon kullanımının gerekli olduğu bir gerçektir. Halbuki normal olarak organ kültüründe her zaman hormona gerek yoktur. Çünkü, organ kültürlerinin organize olmuş meristemleri, hormon oluşumunun merkezleri olabilirler. Halbuki kallus kültürlerinin parankimatik dokuları, hormon sentezi kapasitesine sahip değildirler. Bundan başka gıda ortamlarında thiamin, piridoksin ve diğer vitaminler iyi bir büyüme için gereklidir ve genellikle gıda ortamına ilave edilmektedir. Bundan başka asparagin, arginin, üre, glutamin, purin, primidin ve çeşitli aminoasitler her zaman talep edilmemekle beraber, bazı durumlarda faydalıdır.

Bu çalışmanın amacı, Fern çilek çeşidinde farklı eksplant kaynaklarının kallus oluşumu ve rejenerasyon aşamalarında kullanılan farklı hormonlar (2,4-D ve TDZ) ve bunların dozlarının *in vitro* da büyüme ve rejenerasyon karmaşık bir işlemdir. Büyüme ve gelişmeyi pek çok genetik ve çevresel faktör etkilemektedir. Her türün hatta her çeşidin kendine özgü isteği olup hücre farklılaşması için farklı ortam ve temel besin ortamı vardır. Gıda ortamına ilave edilen hormonlara verilen tepkiler türler ve çeşitler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, kullanılan eksplant tipine bağlı olarak rejenerasyon başarısı büyük ölçüde değişmektedir. Bundan dolayı kallus oluşumu,

embriyogenik kallus oluşumu, rejenerasyon ve sürgün oluşumu performanslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması yapılmalıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bitki doku kültürü, bitkilerin çeşitli kısımlarından alınan hücre, doku ve organların sterilize edildikten sonra çeşitli besin maddeleri içeren steril ortamlarda ve uygun çevre koşullarında kültüre alınması ve büyütülmesi işlemidir (Gönülşen 1987). Pratikte kullanımına 1960'lı yıllardan başlanan doku kültürü tekniklerinde, günümüze kadar hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Bu tekniklerde hücre, doku, embriyo ve farklı organlardan alınan eksplantlardan steril koşullar altında ve özel besin ortamlarında yeni kültürlerin üretilmesi amaçlanmıştır (Öksüz 1993). Günümüzde bu teknikler, gen mühendisliği ve biyoteknolojik çalışmalar ile kombine edilerek çok amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bitkilerden alınan farklı eksplant kaynaklarından kallus oluşturmada ve rejenerasyonda ortama değişik büyümeyi düzenleyici maddeler ilave edilmektedir. Bu amaçla en fazla kullanılan maddeler oksin ve sitokin grubu hormonlardır. Oksin tipi hormonlar köklenmeyi, hücre gelişimini ve kallus oluşumunu teşvik ederler. Sitokinler ise hücre bölünmesini, yeniden farklılaşma ve bitki rejenerasyonunu teşvik ederler. Oksin grubu hormonların doğal olarak bulunan en önemli formu Indol-3-asetik asit (IAA)'dir. Ancak IAA'nın ışık ve sıcaklıkta kararsız olması nedeniyle mikroçoğaltımda sınırlı kullanıma sahiptir. Embriyogenesisi teşvik için en fazla kullanılan oksin grubu hormon 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) olmasına rağmen Naftalin asetik asit (NAA), pikloram ve dikamba gibi oksinler ya tek başlarına ya da 2,4 D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Kallus oluşumunu başlatmak için ise sıklıkla 2,4-D tercih edilmektedir. Diğer yandan düşük oksin ve yüksek sitokin konsantrasyonları sürgün morfogenezini teşvik etmektedir (Thorpe 1981; Özgen 1998).

Çilekte yapılan bir araştırmada, değişik çilek klonuna ait yaprak sapı, boğum ve stolon parçalarından kallus elde edilmesi üzerine oksin ve sitokin etkileri ortaya konulmuştur. Denenen otuz iki besin ortamı kombinasyonu arasında 4,0 mg/L NAA + 1,5 mg/L IBA, tüm eksplant tiplerinde en yüksek kallus oluşum oranını vermiştir.

Kallustan adventif sürgün oluşum oranı, MS besin ortamındaki IBA konsantrasyonundan ve eksplant tipinden etkilenmiştir. En yüksek sürgün oluşum oranı Rabi-01 klonuna ait yapraktan elde edilen kalluslarda ve 3 mg/L BA içeren ortamlarda elde edilmiştir (Biswas 2007).

B-302 ve Kama çilek kültür klonlarının yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının kullanıldığı çalışmada 0.0, 1.6, 3.2, ve 6.4 mg/l BAP dozlarının MS besin ortamında rejenerasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Rejenerasyon sadece yaprak eksplantlarında, 3.2 mg/l ve 6.4 mg/l BAP konsantrasyonlarında meydana gelmiştir. Kama kültür klonunda sürgün oluşumu B-302 klonundan daha iyi bulunmuştur. B-302 klonunun yaprak sapı eksplantlarında en iyi rejenerasyon ortalamaları %30 ve %17, yaprakların sürgün rejenerasyonu 3.2 mg/l BAP uygulamasında %6-8 arasında bulunmuştur. BAP' nin bazı konsantrasyonlarında sürgün oluşumu olmamıştır. Kama kültür klonunun sadece 6.4 mg/l BAP uygulamasında rejenerasyon sağlanmıştır. Genellikle her iki tipte de yaprak eksplantlarından meydana gelen rejenerasyon ortalamaları yaprak sapı eksplantlarından daha iyi olmasına rağmen, fidelerin oluşumu oranı yaprak sapı eksplantlarında daha iyi bulunmuştur (Zebrowska 2002).

Elsanta, Senga Sengana, Kaster ve klonları K1349, K1356 çilek genotiplerinin yapraklarının kullanıldığı çalışmada, en iyi sürgün rejenerasyonu Kaster çeşidinde (%86.7-%100), en kötü rejenerasyon ise Elsanta çeşidinde (%0-%27.8) bulunmuştur. Kaster çeşidinin yaprak ayası eksplantlarında sürgün rejenerasyonu yani direkt organogenesis meydana gelmiştir. Oysaki diğer uygulamalarda kallus rejenerasyonu meydana gelmiştir. En iyi rejenerasyon oluşumu Kaster, Elsanta ve 2 klonda, MS tuzları ve vitaminle desteklenmiş 1.5 mg/l BA ve 0.1 mg/l IBA uygulamalarında elde edilmiştir. Senga Sengana da ise MS tuzları ve B₅ vitaminiyle desteklenmiş 3.0 mg/l BA ve 0.25 mg/l IBA uygulamalarında sürgün rejenerasyonu iyi bulunmuştur (Wawrzynczak 1998).

Bir çilek klonu olan Pbgel-2000 bitkisinin yaprak ve gövde parçası eksplantlarında kallus oluşumu ve kalluslardaki somatik embriyogenesis oluşumları incelenmiştir.

Uygulamalarda en yüksek somatik embriyogenesis oluşumunun MS ortamındaki 1.0 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP ve Prolin'le desteklenmiş ortamda meydana geldiği belirlenmiştir. Rejenere bitkiler (%90-95) başarılı bir şekilde sera ve dış ortama transfer edilmiştir (Biswas 2007).

Çilek çeşitleri (Darselect, Xinxing No.2, Honeoye ve Tudla) ve TDZ, IAA kombinasyonlarının sürgün oluşumlarına etkilerinin incelendiği bir çalışmada, en iyi sürgün rejenerasyonu oluşumu Xinxing No.2 ve Tudla çeşitlerinin yaprak disk eksplantlarında %94.2 ve %87.9 oranlarında saptanmıştır. Hormon uygulamalarında ise MS+TDZ 2.0 mg/l+IAA 0.1 mg/l uygulamasında sürgün oluşumları yüksek (%79.6) olarak tespit edilmiştir. Darselect çeşidinde ise MS+TDZ 8 mg/l+IAA 0.1 mg/l dozunda sürgün oluşumları yüksek (%79.6) bulunmuştur. Eksplant kaynağı açısından ise, aynı genotiplerde çiçek sapı eksplantlarının rejenerasyonu yaprak disk eksplantlarından daha iyi bulunmuştur (Yin *et al.* 2003)

Aygün ve ark.(2006)'da bazı ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) genotiplerinde yaprak disklerinden *in vitro* sürgün organogenesisini uyarmak için yapılan çalışmada bitkisel materyal olarak, Quince A (bodur), S.Ö. (Sabahattin Özbek) 39-200 (bodur), S.Ö. 18-82 (orta kuvvetli) ve S.Ö. 58-315 (kuvvetli) klon anaçları ile Eşme, Limon ve Çukurgöbek çeşitleri kullanılmıştır. Organogenesis için iki denemede TDZ + NAA kombinasyonları ya da BA + NAA, AgNO₃ ve putresin uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Sürgün organogenesisi sadece 0.33 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA+2.0 mg/l AgNO₃ içeren MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamında önemli düzeyde uyarılmıştır. Bu uygulama ile sürgün oluşturma oranı Quince A'da %80.0, S.Ö. 39-200'de %56.7, S.Ö. 18-82'de %17.5, S.Ö. 58-315'de %37.5, Eşme'de %36.7, Limon'da %40.0 ve Çukurgöbek'de %43.3 olarak belirlenmiştir. Ortalama sürgün sayısı ise genotiplere göre 0.4-2.7 adet/disk arasında değişmiştir (Aygün 2006).

Soylu ve Ertürk (1999), bazı kestane çeşitlerinin klonal çoğaltımı için koltuk tomurcuğu ve sürgün ucu kültürünü uygulamışlardır. Ancak bu çalışmada başarı sınırlı kalmış ve özellikle yaşlı ağaçlardan alınan eksplantlarla çalışmanın daha güç olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir araştırmada bitkisel materyal olarak Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden alınan gövde ve yaprak sapı eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonları üzerine eksplant tipi, besin ortamları ile ışıklandırma süresinin etkileri incelenmiştir. Eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D, zeatin, IBA ve kazein hidrolizat içeren MS ve NN ortamlarına dikildikten sonra aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Araştırma sonucunda kallus oluşturan eksplant oranı, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu, adventif sürgünlerin bitkiye dönüşüm oranı eksplant tipine, besin ortamlarına ve ışıklandırma süresine göre değişmiştir. Buna göre gövde eksplantları direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçları verirken; ortamlar içinde kallus oluşumu en fazla 0,2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+2,5 mg/l IBA içeren MS ve yalnızca 2 mg/l 2,4-D içeren NN ortamlarından, direkt adventif sürgün gelişimi de 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı ile 2 mg/l BAP içeren NN ortamında bulunmuştur. İndirekt adventif sürgün gelişimi ise 0,2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+1 g/l kazein hidrolizat katkılı MS ortamı ile 2 mg/l zeatin NN ortamından elde edildiği belirlenmiştir. Karanlık kültür koşulları kallus oluşumu üzerinde olumlu etkiler de bulunurken; 16/8 sa ışıklandırma ise direkt-indirekt adventif sürgün gelişimini artırdığı tespit edilmiştir (Babalık 2008).

Hepaksoy ve Tanrısever (2004), bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerine yapmış oldukları çalışmada Gisela 6 kiraz anacının mikrosürgünlerinde köklenme oranının Gisela 5'e göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Köklendirme ortamına 2 g/l-1 aktif kömür ilavesinin köklenme oranını %8.33–33.33'ten %25–50'ye yükselttiği görülmüştür.

Verime yatmış melez fındık (*Corylus avellana* L.) bitkileriyle yapılan bir çalışmada dormant çeliklerin sürmesi ile meydana gelen taze sürgünlerden alınan gözler 6.7 mM, 11.1 mg/l veya 15.5 mg/l N-6 benziladenin (BA) ile poliaminler (0.2 mg/l putresin+0.2 mg/l spermidin+0.05 mg/l spermin) içeren veya içermeyen Murashige ve Skoog [MS (1962)] ortamı ve modifiye Driver ve Kuniyuki [DKW (1984)] ortamı üzerine kültüre alınmıştır. Kültür ortamı ile BA'nın eksplant reaksiyonları üzerine olan etkileri önemsiz bulunmuştur. Ortama ilave edildiklerinde, poliaminlerin sürgün uzunluğunu %83 ve

sürgün başına tomurcuk sayısını %41 oranında artırma sonucu çok etkili oldukları gözlenmiştir. Poliamin içeren ortam üzerindeki bazı sürgünlerin 4.0 cm'ye kadar, poliamin içermeyen ortam üzerindeki sürgünlerin ise en fazla 2.0 cm'ye kadar büyüyebildikleri gözlenmiştir. Bulgular, ortama ilave edildiklerinde poliaminlerin eksplantların kültüre alınmalarını kolaylaştırabileceğini ve morfojenik kapasitelerini artırabileceğini göstermiştir (Nas 2003).

Yalçın ve arkadaşları (2003), kültür ortamına 0.3 mg/l IBA ilave ederek Hayward kivi çeşidinin mikrosürgünlerinde %93 civarında köklenme elde etmişlerdir. Benzer şekilde, mikrosürgün diplerinin 5 saniye süreyle 400 mg/l IBA solüsyonuna bandırılmasıyla %95 civarında ex vitro köklenme oranı elde edilmiştir.

Araştırmada dört farklı badem çeşidinin (Ne Plus Ultra; Non Pareil, Carmel, Parkinson) olgun olmayan kotiledonlarından genç sürgünler rejenere edilmiştir. Açık tozlanmış meyveler tam çiçeklenmeden 100-115 gün sonra bahçeden toplanmıştır. Kotiledonların bitim noktaları kesilip çıkarılmıştır. TDZ ve IBA'nın farklı konsantrasyonları ve kültürün ilk bir haftasında ışıklı ve ışısız ortamların etkisi belirlenmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı bitki büyümesini düzenleyicilerin bulunmadığı dört haftalık süreyi takiben, TDZ (10.0 µM) içeren MS alt kültüründe 8 hafta için kültüre alınan kotiledonlarda en yüksek olmuştur. Kotiledonlar 7 gün için karanlıkta tutulmasıyla rejenerasyon seviyesi çok daha fazla olmuştur. IBA (0.5 µM) önemli oranda genç sürgünlerin gelişimini azaltmıştır (Ainsley *et al.* 2004).

Bhagwad and David Lane (2004), yaptıkları bir çalışmada *Prunus avium*'un Lapins ve Sweetheart çeşitlerinin yaprak parçalarından *in vitro*'da NAA ve TDZ (Thidiazuron) veya BA ilave edilmiş. WPM ortamında üretiminde bitki yenilenmesi (regenerasyon) üzerine bitki büyümeyi düzenleyiciler, explant tipi, bitki üzerindeki yeri ve kesim durumunun etkili olduğu; optimal regenerasyonun 2.27 veya 4.54 µM TDZ'ye ilave olarak 0.27 µM NAA içeren besi ortamında bütün bir yaprağın ortadamar boyunca yaprağın enine kesilen ve en üst yüzeyinin kültüre alınması sonucu elde edildiğini; regenerasyonda iki çeşit arasında bir farklılık bulunmadığını; bitki regenerasyonunda

sonuçta her explanttan bir veya daha fazla sürgün elde edilmesinde Lapins'te %71.4 ve Sweetheart çeşidinde %54 olarak elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırma Keten (*Linum usitatissimum* L.) çeşitleri olan Madaras, 1886 Sel. ve Omega ile yapılmıştır. İn vitro ve serada yetiştirilen fidelerden alınan hipokotil ve sap eksplantları, sürgün veren explant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki toplam sürgün sayısı bakımından karşılaştırılmıştır. Eksplantlar arasında hipokotil en iyi rejenerasyonu vermiştir. Eksplant kaynağı olarak in vitro yetiştirilen fideler, serada yetiştirilen fidelere göre daha uygun bulunmuştur (Yıldız 2001).

Bu çalışmada, kinetin ve α - naftalin asetik asitin (NAA)'in farklı konsantrasyonlarının (kinetin ve 0.1+0.1, 0.2, 0.4 NAA mg/l), uzun yapraklı üçgül (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) bitkisinin hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen sürgün yüzdesi, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, sürgün oluşturan explant yüzdesinin en yüksek oranda (%91.7) hipokotil eksplantından ve Murashige and Skoog (MS) içinde 1 mg/l Kinetin+0.4 mg/l NAA içeren ortamdan; en düşük sürgün yüzdesinin (%25.0) hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarının her ikisinde de 1 mg/l Kinetin+0.1 NAA içeren rejenerasyon ortamında geliştiği belirlenmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 11.2±1.3 adet ile 1 mg/l Kinetin+0.4 mg/l NAA içeren ortamdan, en düşük sürgün sayısı 2.5±0.6 adet ile 1 mg/l kinetin+0.1 NAA uygulamasında gözlenmiştir. En uzun sürgün gelişimi 3.5±0.5 cm ile (1 mg/l kinetin+ 0,1 mg/L NAA) içeren MS ortamında, en kısa sürgün gelişimi ise 1.5±0.2 cm ile 1 mg/l kinetin+0.4 NAA MS ortamında belirlenmiştir. *Trifolium pannonicum* JACQ. ssp. *elongatum* bitkisinden maksimum kök gelişimi %95±2.9 ile 1 mg/l IBA uygulamasından elde edilmiştir (Demirbağ 2008).

Yapılan diğer bir araştırmaya göre ise yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 6 farklı burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenleri değişik oranlarda TDZ içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında kültüre alınmıştır. Thidiazuron (TDZ) konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan eksplantların sürgün rejenerasyonuna etkisi geniş bir varyasyon göstermiştir.

En yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı %90 ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı da 22 adet olarak belirlenmiştir. Sekizinci hattan elde edilen adventif sürgünler farklı konsantrasyonlarda 6-benzilaminopurin (BAP), α -naftalenasetik asit (NAA) ve Thidiazuron (TDZ) içeren ortamlarda hızlı çoğaltıma alınmıştır. Burada eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 7.33 adet ile 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamından sağlanmıştır. Gelişen sürgünler daha sonra, 2 mg/l indol-3-bütirik asit (IBA) içeren MS ortamında köklendirilmiştir (Erdoğan 2004).

Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle adventif sürgün rejenerasyonunun geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, altı kolza çeşidine ait hipokotil ve gövde eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin 6-benzylaminopurine (BAP), α -Naphtaleneacetic acid (NAA), Thidiazuron (TDZ)) kombinasyon halinde bulunduğu MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek sürgün rejenerasyon oluşturan çeşit %90 oranında 3 mg/l BAP+0,2 mg/l NAA kombinasyonunu içeren MS ortamlı Spok olarak tespit edilmiştir (Darçın 2003).

Yapılan bir çalışmada haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin tohumları MS besi ortamında çimlendirilmiştir. Bu ortamda yetişen bitkilerin hipokotil eksplantlarından 1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında kallus kültürleri elde edilmiştir. Bu kallusların hormonsuz besi ortamına aktarılmasıyla somatik embriyogenez ortaya çıkmıştır. Aynı ortamda alt kültüre alınmaya devam edilen embriyolardan ileri dönemde rejenerasyon sürgünler gelişerek tam bir bitkiciğe dönüşmüşlerdir (Oluk 2005).

Chawla and Wenzel (1987), arpada sürgün rejenerasyonunun hormonsuz ortamda ya da 2,4-D'nin düşük konsantrasyonlarında IAA ve BAP içeren ortamlardan daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Zhou and Lee (1983) "Chinese spring" ve "Frederick" buğday çeşitlerinde 2,4-D ve diğer 12 oksin tipinin olgun embriyodan kallus oluşum oranına etkisini araştırmışlardır.

Bu araştırma sonucunda kallus oluşum oranının ve uygun oksin tipinin çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir.

Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipler arasındaki farklılığın içsel (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

Vitanova *et al.* (1994), arpada 2,4-D'nin bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmış, 10 mg/l 2,4-D'nin hem kallus oluşumu hem de bitki rejenerasyonu üzerine olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Tanner and Scott (1986), buğdayın olgunlaşmamış embriyolarının epiblastlarından embriyogenik kallus oluşumunu etkileyen faktörleri inceledikleri çalışmada embriyolar MS ortamında skutellumları yukarı gelecek şekilde ortama almışlardır. Epiblastlardan kallus oluşumunun genotip, embriyonun gelişim devresi ve 2,4-D konsantrasyonu tarafından etkilendiği, embriyogenik kallus oluşturan embriyo sayısının genotiplere göre %10-72 arasında değiştiği belirlenmiştir. Embriyogenik kallus oluşumu için 2,4- D'nin 1µM'dan daha yüksek seviyede olması gerektiği saptanmış ve hormonsuz ortama aktarıldığında daha fazla epiblast kallus farklılaşarak embriyo oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarında çalışan Kintzios *et al.* (1996) en yüksek kallus oluşumunu 2,4-D ve sitokinin içeren MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında elde etmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada materyal olarak Fern ilek çeşidinin farklı organları eksplant kaynağı (kol uçları, genç yaprak ve yaprak sapı) olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ilek çeşidi

eşit	zellikleri
FERN	Nötr gün çeşididir. Yayla bölgeleri için önerilmektedir. Verimli bir eşitir. Yaz dikimine uygundur.

3.1.1. Materyal

Bitki materyali olarak Fern ilek çeşidi kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.a. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar

- %70'lik etil alkol
- %15'lik sodyum hipoklorit

3.1.2.b. Kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar

Kallus, embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında Murashige and Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524] ve vitaminleri [Sigma M3900] kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları izelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları (Murashige and Skoog 1962)

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktar(mg/l)
İNORGANİKLER	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	332,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	180,7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA	37,26
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
ORGANİKLER	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

3.1.2.c. Çalışmada kullanılan jel yapıcı maddeler

Çalışmada kallus oluşum ortamında ve bitki rejenerasyonu ortamında jel yapıcı madde olarak agar (7 g/l) kullanılmıştır.

3.1.2.d. Çalışmada kullanılan oksin, sitokin tipleri

- 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)
- TDZ (Thidiazuron)

3.2. Yöntem

Bu çalışmada, fern çilek çeşidinin kollarından alınan kol uçları steril edildikten sonra genç bitki oluşumu için agar (7 g/l) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür ortamında elde edilen temiz bitkilerin yaprak ve yaprak sapları kallus oluşumu için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 2,4-D'nin 5 dozunun (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg/l) ilave edildiği yarı katı MS ortamında kültüre alınan eksplantların kallus oluşum durumları incelenmiştir. Deneme tam şansa bağlı deneme planına göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her tekerrürde 5 adet eksplant kullanılmıştır. Yaprak ve yaprak sapları $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 3 hafta süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda eksplantlarda kallus oluşumu, eksplant sayısına göre kallus oluşumu, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu ve kallus aşamasındaki kök oluşumu parametreleri incelenmiştir. Bitki rejenerasyonu için, 2,4-D'nin (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg/l) dozunda meydana gelen kalluslar TDZ'nin dozlarıyla (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) kombinasyonları yapılarak 3 tekerürlü olarak MS ortamına aktarılmıştır. Bitki rejenerasyonu için meydana gelen kalluslar $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 8: 16 saat karanlık: ışık fotoperiyotta bekletilmiştir. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası ve yoğunluğu olarak 1500 luks kullanılmıştır. Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında aşağıdaki şu işlemler uygulanmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon teknikleri

3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan aletler (bisturi, pens v.b.) etüvde (150⁰C, 2 saat) steril edilmiştir. Steril kabin içi çalışmadan önce %70'lik etil alkolle silinmiş ve UV lambası açılmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Eksplantların kesimi aliminyum folyo içine sarılarak etüv edilmiş 10x15 cm boyutlarındaki kurutma kağıtlarına sarılmış fayans üzerinde yapılmıştır. Kabin içine alınan aletler (bisturi, pens) yaprak ve yaprak saplarının her kesiminden önce sterilizatörle steril edilmiştir.

3.2.1.b. Yaprak, yaprak sapı ve tomurcuğun yüzey sterilizasyonu

Kullanılacak materyaller musluk suyunda yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde %70'lik etil alkolde 1 dakika, %30'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde de 6 dakika karıştırılarak bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılmış materyaller saf su ile 3 kez yıkanmıştır.

3.2.1.c. Besin Ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu

Besin ortamları otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C'de steril edilmiştir. Sıcakta bozulan vitamin ve bitki büyüme düzenleyicileri 0,22 µm poroziteli selüloz filtreler (milipor) yardımıyla sterilize edilmiş ve gıda ortamına otoklavdan çıkarıldıktan sonra ilave edilmiştir.

3.2.1.d. Steriliasyonda kullanılan çözeltilerinin hazırlanışı

%70'lik Etil alkolün hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 365 ml alınmış ve hacim 500 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır.

%30'lik çamaşır suyu çözeltisinin hazırlanışı: NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari *Domestos*® marka çamaşır suyundan 150 ml alınarak hacim 500 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır.

3.2.2. Kallus oluşum ortamı

Oksin ve sitokinin stok çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ve saklama sıcaklıkları ile çalışma konsantrasyonları izelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Oksin ve sitokinin stok çözeltilerinin hazırlanışı

Oksin tipi	özücü	Seyreltici	Saklama koşulu	çalışma konsantrasyonu
2,4-D	Etil alkol	su	+5 ⁰ C	0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l
Sitokinin tipi				
TDZ	KOH	su	+5 ⁰ C	0,5, 1.0, 2.0 mg/l

3.2.2.a. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

- 1 litrelik bir behere 500 ml bidistile su konulmuştur.
- Murashige and Skoog(1962) tuzları [Sigma M5524], 30 g sakkaroz tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
- Dereceli silindirde hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- Beherdeki karışım tamamen özölünce manyetik karıştırıcı üzerinde 1 N NaOH ve HCl solüsyonları kullanılarak pH 5,7' ye ayarlanmıştır.
- 7 g agarla karıştırılan çözelti otoklavda 15 dk boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.

6. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 1 lt'lik MS vitamin solüsyonundan (1000X) 1 ml kullanılmıştır.
7. Bitki büyüme düzenleyicileri (2,4-D) milipordan geçirilerek sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l (2,4-D) farklı oranlarda eklenmiştir.

3.2.3. Bitki rejenerasyon ortamı

3.2.3.a. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 1 litrelik bir behere 500 ml bidistile su konulmuştur.
2. Murashige and Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524], 30 g sakkaroz tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Dereceli silindirde hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
4. Beherdeki karışım tamamen çözülünce manyetik karıştırıcı üzerinde 1 N NaOH ve HCl solüsyonları kullanılarak pH 5,7'ye ayarlanmıştır.
5. Çözelti 200 ml'lik erlenlere aktarılıp her biri 1,4 g agarla karıştırılarak otoklavda 15 dk boyunca 105 kPa basınçta 121⁰C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.
6. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. 200 ml'lik erlenlere 200µl vitamin eklenmiştir.
7. Bitki büyüme düzenleyicileri (TDZ) milipordan geçirilerek sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte 0,5, 1.0, ve 2.0 mg/l (TDZ) oranlarında farklı kombinasyonlar halinde eklenmiştir.

3.2.4. Araştırmada incelenen konular

1. Kallus oluşum oranı (KOO) (%): Eksplantlar kallus oluşum ortamına alındıktan 22 gün sonra şu formüle göre belirlenmiştir.

$KOO (\%) = \text{Oluşan kallus sayısı} / \text{kültüre alınan eksplant sayısı} \times 100$

2. Embriyogenik Kallus Oluşumu: (%)

a) Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO): (%)

$ESEKO = \text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{Eksplant sayısı} \times 100$

b) Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu(KSEKO): (%)

$KSEKO = \text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{Kallus sayısı} \times 100$

3. Kök oluşumu (%): Kök oluşturan eksplant sayısına göre belirlenmiştir.

$\text{Kök oluşumu} = \text{Kök oluşturan eksplant sayısı} / \text{Eksplant sayısı} \times 100$

4. Rejenere bitki sayısı(%):Oluşan yeni bitkilere göre belirlenmiştir.

$\text{Rejenere bitki sayısı} = \text{Bitki sayısı} / \text{Eksplant sayısı}$

3.2.5. Verilerin istatistik analizi

Bu araştırmada Kallus, Embriyogenik kallus (Eksplant ve kallus sayısına göre) ve kök oluşumu üzerine 2 eksplant tipinin(Yaprak ve yaprak sapı) ve 2,4-D'nin 6 farklı dozunun (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) etkisi 2x6 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine tabii tutulmuştur. Ayrıca, yukarıdaki 2 faktöre ilave olarak bitki rejenerasyon ortamındaki TDZ'nin 3 farklı dozunun (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) rejenere bitki sayısına olan etkileri 2x5x3 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizi uygulanmıştır. Bu aşamada 2,4D'nin 0.0 mg/l (kontrol) dozunda kallus meydana gelmemiş ve bu yüzden 2,4D'nin farklı dozlarının

rejenere bitki sayısına olan etkisinde bu doz dışındaki diğer dozlar (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0mg/l) denemede kullanılmıştır. Araştırmada incelenen karakterlere ait ortalamalar arasındaki farklar Duncan Çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Faktörlere ait interaksyonlar basit ana etkisi ile açıklanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada ilek kollarının u kısımları kültüre alınarak laboratuvar Őartlarında temiz bitkiler elde edilmiştir. Bu temiz bitkilerden alınan eksplantların (yaprak ve yaprak sapı) ve farklı dozlardaki bitki büyüme düzenleyicisinin (2,4-D), kallus oluşum oranı (KO), eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO), kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (KSEKO) ve kök oluşumu (%) zerine etkileri belirlenmiştir. Daha sonra ise oluşan kalluslarda farklı seviyedeki bitki büyüme düzenleyicisinin (TDZ) bitki rejenerasyonuna etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1. Kallus Oluşum Aşaması

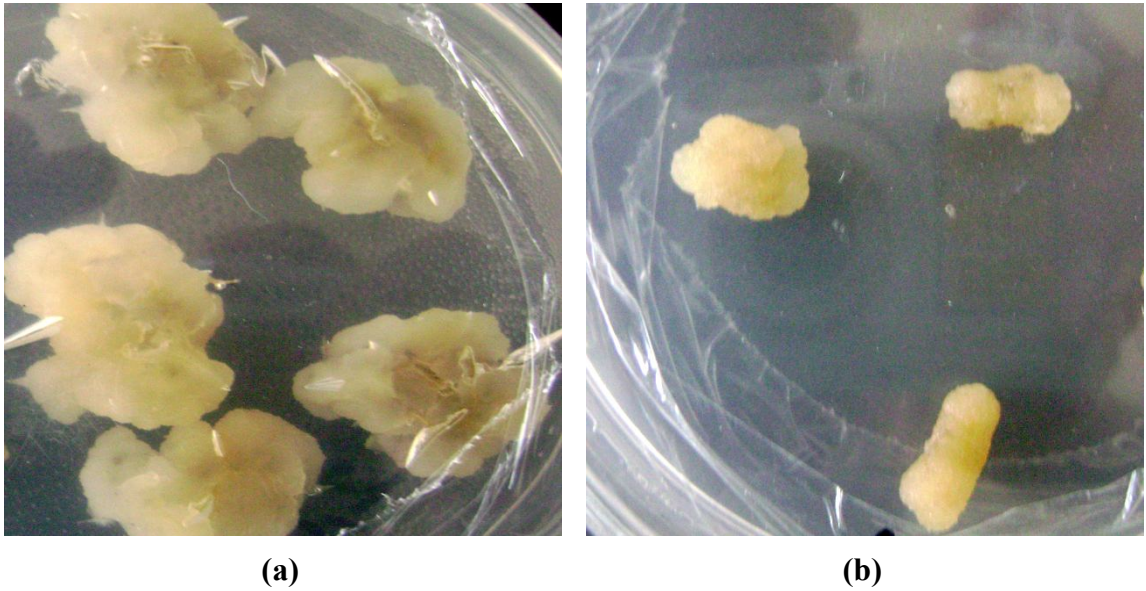
4.1.1. Eksplant tipinin ve 2,4-D uygulamaların kallus oluşum oranına (KO) etkisi

Farklı dozlarda hormon ilave edilen besi ortamlarında farklı eksplant tiplerinin kallus oluşumu üzerine etkisi önemsiz olarak bulunmuştur. Uygulamaların kallus oluşumu üzerine etkisi ise önemli olarak saptanmıştır ($p < 0.05$). En yüksek kallus oluşumu %86,7 ile 1 mg/l 2,4-D uygulamasında tespit edilirken, kontrolde hiç kallus meydana gelmemiştir. Hormon uygulamaları içinde en düşük kallus oluşumu ise 4 mg/l 2,4-D (%26,7) uygulamasında belirlenmiştir. Kallus oluşumu zerine 2,4-D'nin düşük dozlarının olumlu yönde etkileri olup, 1.0 mg/l'ye kadar olan dozlarının yaprak ve yaprak sapındaki kallus oluşumunu artırdığı, fakat 1.0 mg/l'nin üzerindeki dozların kallus oluşumunu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (izelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde kallus oluşum oranı üzerine etkisi (KO)

Eksplant tipi	2,4-D (mg/l)						Ortalama
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
Yaprak	0.0	66.7	86.7	53.3	46.7	26.7	46.7 ^{ns}
Yaprak sapı	0.0	73.3	86.7	53.3	46.7	33.3	48.9
Ortalama	0.0e [*]	70.0b	86.7a	53.3c	46.7c	30.0d	

* : $p < 0.05$ 'de önemli, ns: önemsiz



Şekil 4.1. Farklı uygulamaların kallus oluşumuna etkisi

(a) Yaprak 0.5 mg/l 2,4-D, (b) Yaprak sapı 1.0 mg/l 2,4-D

4.1.2. Eksplant tipi ve 2,4-D dozlarının eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına (ESEKO) etkisi

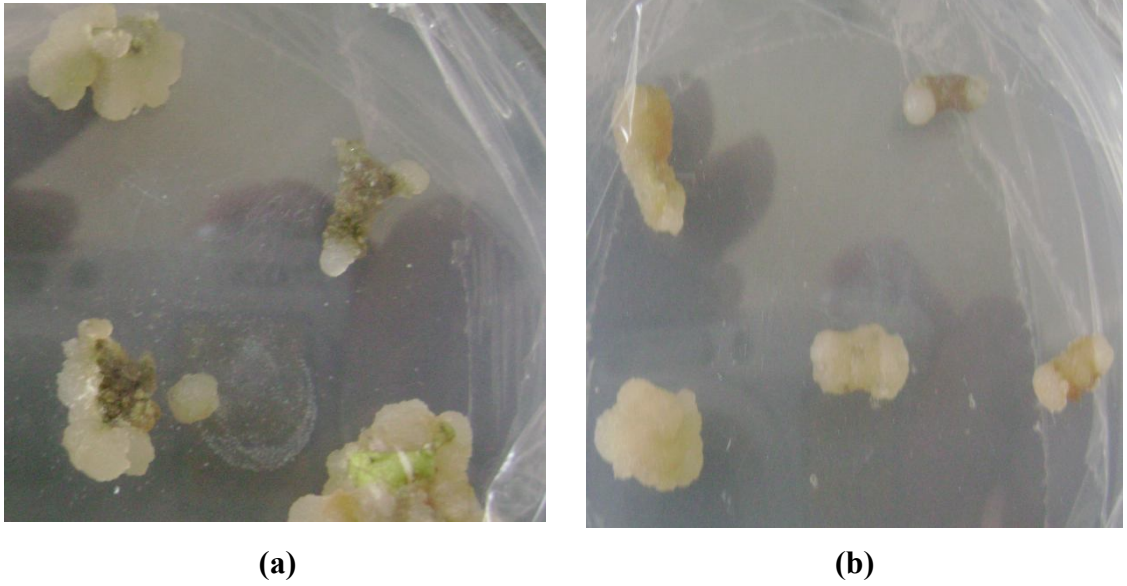
Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyogenik kallus adı verilir. Embriyogenik kallus; sıkı yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklindedir (Hatipoğlu 1999). Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı bakımından 2,4-D dozları arasındaki farklılıklar önemli ($p < 0.05$) olmuştur (Çizelge 4.3). 2,4-D

uygulamalarında en yüksek ESEKO %66.7 ile eksplant tipi yaprak sapı olan 1.0 mg/l'lik dozda gözlenmiştir. 2,4-D dozlarında en düşük ESEKO ise %13.3 ile eksplant tipi yaprak olan 4.0 mg/l'lik dozda belirlenmiştir. 2,4-D'nin 1.0 mg/l'ye kadar olan dozları yaprak ve yaprak saplarındaki eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına (ESEKO) olumlu etkiler yapmıştır. 2,4-D'nin 1.0 mg/l'nin üzerindeki dozları ise eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranını (ESEKO) olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. Eksplant tiplerinin de embriyogenik kallus oluşum üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.3). En yüksek eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumları eksplant tipi olarak hem yaprak sapı hem de yaprakta 2,4-D'nin 1.0 mg/l olan dozunda gözlenmiştir. Eksplant tipi yaprak sapı olanlarda, ESEKO'larının ortalaması eksplant tipi yaprak olanlara göre daha fazla çıkmıştır. ESEKO, yaprak sapında %38.9 iken, yaprak olanlarda %31.1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum üzerine etkisi(ESEKO)

Eksplant tipi	2,4-D(mg/l)						Ortalama
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
Yaprak	0.0	46.7	53.3	40.0	33.3	13.3	31.1 b*
Yaprak sapı	0.0	60.0	66.7	46.7	33.3	26.7	38.9 a
Ortalama	0.0e*	53.3ab	60.0a	43.3bc	33.3c	20.0d	

*: $p<0.05$ 'de önemli



Şekil 4.2. Farklı uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi

(a)Yaprak 1.0 mg/l 2,4-D, (b)Yaprak sapı 1.0 mg/l 2,4-D

4.1.3. Eksplant tipi ve 2,4-D dozlarının kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına (KSEKO) etkisi

Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu bakımından dozlar arasındaki farklılıklar önemli ($p < 0.05$) olmuştur (Çizelge 4.3). En yüksek kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu %88.9'luk oran ile 2 mg/l dozunda meydana gelmiştir. Uygulamalar arası en düşük kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu %50.0'lik oran ile 4 mg/l dozunda bulunmuştur. 2,4-D'nin 0.5 mg/l dozlarında kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumları eksplant tipi yaprak olan uygulamada %69.4, eksplant tipi yaprak sapı olan uygulamada ise %80.6 olarak saptanmıştır. 2,4-D'nin 1.0 mg/l dozundaki kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı yaprakta %61.7 olarak bulunurken yaprak sapında %76.7 olarak tespit edilmiştir. 2,4-D'nin 2.0 mg/l dozunda ise kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu yaprakta %77.8 iken yaprak sapında en yüksek oluşum %88.9 olarak bulunmuştur. 2,4-D'nin 3.0 mg/l dozunda her iki eksplant tipinde de kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu %72.2 olarak belirlenmiştir. 2,4-D nin en yüksek dozu olan 4.0 mg/l de kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu en fazla yaprak sapında %83.3 olarak belirlenmiştir.

Eksplant tipleri arasındaki farklılığın kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumuna etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı uygulamaların Fern çilek çeşidinde kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi(KSEKO)

Eksplant tipi	2,4-D(mg/l)						Ortalama
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
Yaprak	0.0	69.4	61.7	77.8	72.2	50.0	55.2 ^{ns}
Yaprak sapı	0.0	80.6	76.7	88.9	72.2	83.3	66.9
Ortalama	0.0b [*]	75.0a	69.2a	83.3a	72.2a	66.7a	

*: $p < 0.05$ 'de önemli, ns: önemsiz



(a)



(b)

Şekil 4.3. Farklı uygulamaların embriyogenik kallus oluşumuna etkisi

(a) Yaprak 1.0 mg/l 2,4-D, (b) Yaprak sapı 1.0 mg/l 2,4-D

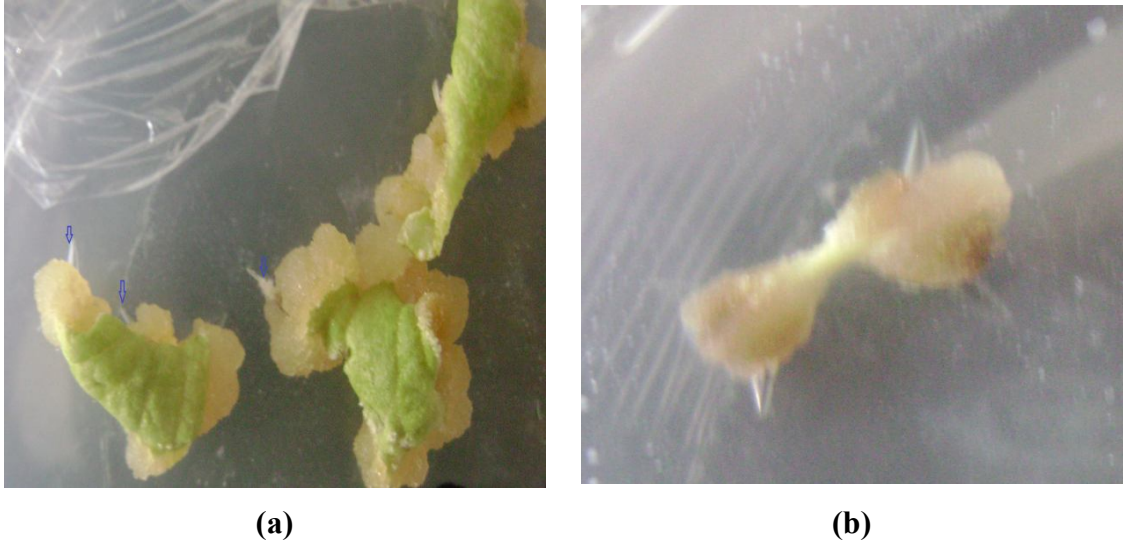
4.1.4. 2,4-D nin ve farklı eksplant tiplerinin kök oluşumuna etkileri(KoO)

Kallus oluşumu aşamasında, meydana gelen kallusların bir kısmında kök rejenerasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu açıdan yapılan incelemede, hem 2,4-D dozlarının hem de eksplant tiplerinin farklılığı kök oluşumu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. En yüksek kök oluşumu eksplant tipi olarak yaprakta ve 2,4-D nin 1.0 mg/l dozunda %86.7 olarak tespit edilmiştir. En düşük kök oluşumu ise yaprak sapında ve 2,4-D nin 4.0 mg/l olan dozunda %13,3 olarak belirlenmiştir. Uygulamalardan 2,4-D nin 1,0 mg/l ye kadar olan dozlarının her iki eksplant tipinde de kök oluşumunu arttırdığı, 1.0 mg/l üzerindeki dozların ise kök oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir. Kallusta kök rejenerasyonuna eğilim bakımından eksplant kaynakları arasında farklılıkların olduğu ve yaprak eksplantlarından oluşan kalluslarda daha fazla kök meydana geldiği belirlenmiştir. Eksplant tipi olarak kök oluşum ortalamalarına bakıldığında ise yaprak eksplantında oluşan kök oluşum ortalamaları %41.1 iken yaprak saplarındaki kök oluşum ortalamaları %18.9 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). 2,4-D nin 0.5 mg/l dozundaki kök oluşumları yaprakta %53.3 iken, yaprak sapında %26.7 olmuştur. 2,4-D nin 1.0 mg/l dozundaki kök oluşumları eksplant tipi yaprak olanda %86,7, ekplant tipi yaprak sapı olanda ise %33,3 olarak bulunmuştur. Eksplant tipi yaprak sapı olanlarda en yüksek kök oluşumu 1.0 mg/l de, en düşük kök oluşumu 4.0 mg/l de meydana gelmiştir. Yaprakta ise en düşük kök oluşumu 4.0 mg/l de %20.0 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı uygulamaların fern çilek çeşidinde kök oluşumuna etkisi(KoO)

Eksplant tipi	2,4-D(mg/l)						Ortalama
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
Yaprak	0.0	53.3	86.7	46.7	40.0	20.0	41.1 a*
Yaprak sapı	0.0	26.7	33.3	20.0	20.0	13.3	18.9 b
Ortalama	0.0d*	40.0b	60.0a	33.3bc	30.0bc	16.7cd	

*: $p<0.05$ 'de önemli



Şekil 4.4. Farklı uygulamaların kök oluşumuna etkisi

(a)Yaprak 1.0 mg/l 2,4-D, (b)Yaprak sapı 1.0 mg/l 2,4-D

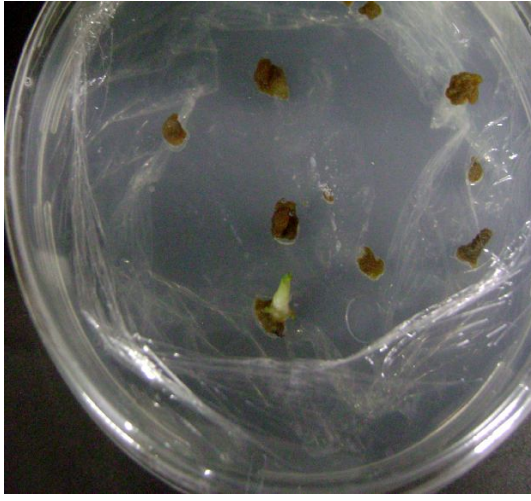
4.2. Rejenarasyon Aşaması

4.2.1. Eksplant tipinin ve uygulamaların sürgün oluşumuna etkileri

Farklı 2,4-D dozu ilave edilen ortamlarda oluşan kalluslar rejenerasyon aşamasında farklı TDZ içeren ortamlara paylaştırılmıştır. Böylece, kallus oluşum aşamasında kullanılan 2,4-D'nin rejenerasyon aşamasındaki etkiside incelenebilmiştir. Rejenere bitki sayısı üzerine eksplant tipinin, 2,4-D dozlarının ve TDZ dozlarının etkisi önemsiz ($p>0.05$) olmuştur. Sürgün oluşumu 2,4-D'nin 0,5 mg/l ve 1.0 mg/l dozlarında yaprak sapından oluşan kalluslardan meydana gelmiştir. Rejenere ortama aktarılan kalluslarda sadece TDZ'nin 1.0 mg/l dozunda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant tipi yaprak olan uygulamalarda sürgün oluşmamıştır. En yüksek rejenere bitki oluşumu %10 ile eksplant tipi yaprak sapında, 2,4-D'nin 0,5 mg/l ve 1.0 mg/l dozlarında, TDZ'nin ise 1.0 mg/l dozunda meydana gelmiştir. Sürgün oluşum ortalamalarına bakıldığında kallus hormon dozu 0.5 mg/l olan 2,4-D ve rejenerasyon ortamındaki 1.0 mg/l TDZ uygulamasında bitki oluşumu %5 olarak tespit edilmiştir. Toplam rejenere bitki oluşumu ortalaması ise %7 olarak belirlenmiştir. Kallus hormonu 2,4-D'nin 2.0, 3.0, ve 4.0 mg/l olan dozlarında ve rejenerasyon hormonu TDZ'nin 0,5 ve 1.0 mg/l dozlarında rejenere bitki meydana gelmemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Rejenerasyon kültür ortamında eksplant tipi ve hormon dozlarına göre sürgün oluşum oranları

Eksplant tipi	Kallus hormon 2,4-D(mg/l)	Rejenerasyon hormon TDZ(mg/l)	Rejenere bitki(%)	Eksplant tipi	Kallus hormon 2,4-D(mg/l)	Rejenerasyon hormon TDZ(mg/l)	Rejenere bitki(%)		Kallus hormon 2,4-D(mg/l)	Rejenerasyon hormon TDZ(mg/l)	Rejenere bitki(%)			
Yaprak	0.5	0.5	0.0	Yaprak sapı	0.5	0.5	0.0	Ortalama	0.5	0.5	0.0			
		1.0	0.0			1.0	10,0			1.0	5,0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	3,3			ortalama	1,7			
	1.0	0.5	0.0		1.0	0.5	0.0		1.0	0.5	0.0	1.0	0.5	0.0
		1.0	0.0			1.0	10.0			1.0	5,0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	3,3			ortalama	1,7			
	2.0	0.5	0.0		2.0	0.5	0.0		2.0	0.5	0.0	2.0	0.5	0.0
		1.0	0.0			1.0	0.0			1.0	0.0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	0.0			ortalama	0.0			
	3.0	0.5	0.0		3.0	0.5	0.0		3.0	0.5	0.0	3.0	0.5	0.0
		1.0	0.0			1.0	0.0			1.0	0.0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	0.0			ortalama	0.0			
	4.0	0.5	0.0		4.0	0.5	0.0		4.0	0.5	0.0	4.0	0.5	0.0
		1.0	0.0			1.0	0.0			1.0	0.0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	0.0			ortalama	0.0			
	Ortalama	0.5	0.0		Ortalama	0.5	0.0		Ortalama	0.5	0.0	Ortalama	0.5	0.0
		1.0	0.0			1.0	4,0			1.0	2,0			
		2.0	0.0			2.0	0.0			2.0	0.0			
		ortalama	0.0			ortalama	1,3			ortalama	7,0			



(a)



(a)



(b)



(b)

Şekil 4.5. Rejenerasyon ortamında oluşan sürgünlerin görünümü

(a) 1.0 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l TDZ deki sürgün oluşumu

(b) Oluşan rejenere bitkinin görünümü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, ilek bitkisinin yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılarak, kallus oluşumuna eksplant tipinin, oksin tipinin (2,4-D), oksin dozlarının (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0) etkisi incelenmiştir. Bu faktörlerin kallus oluşum oranı (KO), embriyogenik kallus oluşum oranı [eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (ESEKO) ve kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO)]ve kök oluşumu oranı (KoO) üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada rejenerasyon ortamına ilave edilen TDZ'nin (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) rejenere bitki sayısına olan etkisi de tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada költür ortamında oluşan kallus sayısına ve kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu üzerine eksplant tiplerinin etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Eksplant sayısına göre embriyogenik kalus oluşumu üzerine ise eksplant tiplerinin etkileri istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Kök oluşumu üzerine eksplant tiplerinin etkileride istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yaprak sapı eksplantlarında en yüksek kök oluşumu %41.1 iken yaprak eksplantlarında %18.9 olarak bulunmuştur. Eksplant sayısına göre en yüksek embriyogenik kallus oluşumu yaprak sapı eksplantlarında %38.9 iken yaprak eksplantlarındaki kallus oluşumu %31.1 olarak bulunmuştur. Nitekim, Babalık ve ark (2008) asmada eksplant tipinin kallus oluşturan eksplant oranı, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşum oranı ile adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranları üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, kallus oluşturan eksplant oranı bakımından en iyi sonuç %32,82 ile yaprak sapı eksplantından elde edilirken; Cheng and Reisch (1989), Göktürk Baydar (2000), Gök Tangolar (2002) ve Göktürk Baydar ve etin (2003) tarafından yapılan araştırmalarda'da yaprak sapı eksplantlarının yaprak ayalarına göre daha başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Yaprak sapının, kallus oluşturma özelliğinin daha iyi olmasının sebebi hormon içeriğinin ve hücrelerin bölünebilme yeteneğinin daha uygun olması olabilir.

Eksplant tiplerinin yanı sıra eksplantların alındıkları ana bitkilerin yetiştikleri ortam şartları da eksplantların *in vitro* rejenerasyon kapasiteleri üzerine oldukça etkili olmaktadır. *In vitro*'da yetişen bitkilerden alınan eksplantların çok daha başarılı olduklarının belirlenmesi üzerine, araştırmada kontrollü koşullarda yetişen bitkilerden alınan eksplantlar kullanılmıştır. Nitekim *in vivo* ve *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantları kullanan Clog *et al.* (1990) da *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların *in vitro* koşullarda daha iyi rejenere olduğunu belirtmiş ve bunun nedeninin de *in vivo*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması ve doku zararlanmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar, Gök Tangolar (2002) tarafından da tespit edilmiştir.

Araştırmada kültür ortamında oluşan kallus sayısı, eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu ve kök oluşumu üzerine 2,4-D'nin etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek kallus oluşumu %86,7 ile 1 mg/l 2,4-D uygulamasında tespit edilirken, en düşük kallus oluşumu %26,7 ile 4 mg/l 2,4-D uygulamasında bulunmuştur. Kallus oluşumu üzerine 2,4-D'nin düşük dozlarının olumlu yönde etkileri olup, 1.0 mg/l'ye kadar olan dozlarının yaprak ve yaprak sapındaki kallus oluşumunu artırdığı, fakat 1.0 mg/l'nin üzerindeki dozların kallus oluşumunu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Eksplant sayısına göre en yüksek embriyogenik kallus oluşumu 1 mg/l uygulamasında %60 olarak bulunurken, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu ise en yüksek 2 mg/l dozunda %88,9 olarak tespit edilmiştir. Yüksek dozların (3-4 mg/l) embriyogenik kallus oluşumuna olumsuz etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Araştırmada saptanan bu bulgular; Fern çilek çeşidi bitkisinin yaprak ve yaprak sapından kallus oluşturmada optimum 2,4-D konsantrasyonunun 1.0 mg/l olduğunu göstermektedir. Yüksek 2,4-D dozlarının olumsuz etkisinin sebebi bünyesel oksin konsantrasyonları ile ilişkisi olabilir. Gıda ortamına 1 mg/l 2,4-D ilavesine kadar etkisinin olumlu olması bünyesel oksin konsantrasyonunu optimum seviyelere yükseltirken, daha yüksek dozlarda etkisinin olumsuz olmasının sebebi, bünyesel oksin seviyelerini optimumun üzerine çıkarması olabilir.

Rejenere bitki sayısı üzerine eksplant tipinin, 2,4-D'nin ve TDZ dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olmuştur. Sürgün oluşumu sadece yaprak sapından oluşan kalluslardan meydana gelmiştir. Eksplant tipi yaprak olan uygulamalarda sürgün oluşmamıştır. *In vitro* çalışmalarda, adventif sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri olduğu ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Özcan vd 1993; Özcan vd 1996; Sancak; 1999; Uranbey vd 2003). Genel olarak sitokininler sürgün oluşumunu oksinler ise kallus ve kök oluşumunu teşvik etmektedirler. Uygun bir oksin-sitokinin dengesi ile bitkilerde yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde edilebilmektedir. Ancak, en uygun oksin-sitokinin dengesinin eksplantın tipine göre de değiştiği yine aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada, sadece yaprak sapından sürgün rejenerasyonunun meydana gelmesinin sebebi, yaprak dokusuna göre daha dengeli bir oksin- sitokinin oranına sahip olması olabilir. Ayrıca, yaprak sapından elde edilen kalluslardaki hücrelerin ortama ilave edilen sitokininlere daha duyarlı olmaları da sürgün rejenerasyonunun meydana gelmesine katkı yapmış olabilir.

Sonuç olarak, Fern çilek çeşidinde kallus oluşumu açısından bitkinin yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumu daha yüksek bulunmuştur. En yüksek kallus oluşumu ise 2,4-D'nin 1 mg/l uygulamasında elde edilmiştir. Kök oluşumu yaprak sapına göre yaprak eksplantında daha yüksek bulunmuştur. En yüksek kök oluşumu 2,4-D'nin 1.0 mg/l dozunda elde edilmiştir. Rejenere bitki ise sadece yaprak sapı eksplantlarında ve 1.0 mg/l TDZ dozlarında elde edilmiştir. Buna göre, özellikle yapılacak çalışmalarda kallus oluşum aşamasında eksplant kaynağı olarak yaprak saplarının, 2,4-D dozu olarak 1.0 mg/l'nin, rejenerasyon aşamasında 1.0 mg/l TDZ'nin kullanılması tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR

- Ainsley, P.J., Hammerschlag, F.A., Bertozzi, T., Collins, G.G., Sedgley, M., 2004. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 221–226.
- Aygün, A., Dumanoğlu, H., 2006. Bazı Ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotiplerinde Yaprak Disklerinden Sürgün Organogenesisi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2006, 13 (1) 54–61.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 2.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Babalık, Z., Baydar, G., N., 2008. Asmada (*Vitis Vinifera* L.) Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarından Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, 32260 Isparta.
- Bajaj, Y.P.S., 1986. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1. Trees. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Bhagwad, B., David Lane, W., 2004. *In vitro* Shoot Regeneration from Leaves of Sweet Cherry (*Prunus avium*) ‘Lapins and ‘Sweetheart’. *An International Journal on Biotechnology of Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 59(3): 203-208.
- Bhaskaran, S., Smith, R. H., 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop science*, 20, 1328-1336.
- Biswas, K. M., Roy, K. U., Islam, R., Hossain, M., 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 90:49–54, Department of Botany, University of Rajshahi, Bangladesh.
- Biswas, K. M., Roy, K. U., Islam, R., Hossain, M., 2007. Üç değişik çilek (*Fragaria* sp.) klonunda yaprak sapı, boğum ve stolon parçalarından kallus kültürü. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, 430070, China, Department of Botany, University of Rajshahi, Bangladesh.
- Carman, J. G., 1990. Embriyogenik cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In vitro Cell Dev. Biol.*, (26), 746-753.
- Chawla, H. S., Wenzel, G., 1987. Regeneration potential of callus from wheat and barley. *Archiv fur Zuchtungsforschung*, 17(6), 337–343.
- Cheng, Z.M. and Reisch, B.I., 1989. Shoot Regeneration from Petioles and Leaves of *Vitis labruscana* Catawba. *Plant Cell Reports*, 8(7), 403-406.
- Clog, E., Bass, P. and Walter, B., 1990. Plant Regeneration by Organogenesis in *Vitis* Rootstock Species. *Plant Cell Reports*, 8(12), 726-728.
- Darçın, E.S., 2003. Bazı Kolza (*Brassica napus* L.) Çeşitlerinde Doku Kültürü Yöntemiyle Bitki Rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

- Demirbağ, Ş. N., Kendir, H., 2008. Uzun Yapraklı Üçgülün (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) Hipokotil ve Yaprak Sapı Eksplantından *in vitro* Çoğaltılması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Tarım Bilimleri Dergisi 2009, 15 (4) 319-323. Ankara.
- De Jong AJ, Schimidt EDL, De Vries SC (1993). Early events in higher-plant embriyogenesis. Plant Mol.Biol., 22:367-377.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C., Arslan, O., 2004. Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım. Tarım Bilimleri Dergisi 2005, 11(1) 60-64.
- FAO, 2011. Statistical database. <http://www.fao.org>.
- Göktürk Baydar, N., 2000. Asmada (*Vitis spp.*) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. Turk J. Biol., 24, 645-656.
- Göktürk Baydar, N. ve Çetin, S., 2003. Asma Yaprak Eksplantlarının *In Vitro* Gelişmeleri Üzerine Genotip, Eksplant Tipi ve Besin Ortamlarının Etkileri. 13. Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı, 99-104, Çanakkale.
- Gök Tangolar, S. 2002. Asmalarda Somatik Embriyogenesis ve Organogenesis Yoluyla Bitki Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 165 s., Adana.
- Gönülşen, N., 1987. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Md. Yayın No: 78, 83 s, Menemen, İzmir.
- Gürel, E., Uçar Türker A., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi, 36-70.
- Hancock, J. F. 1999. Strawberries. Deparmant of Horticulture Michigan State University, East Lansing Michigan- USA.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ders Kitapları. Yayın No:A-58.
- Hepaksoy, S., Tanrısever, A. 2004. Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar II. Köklenme ve Dış Koşullara Alıştırma. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 41 (3): 23–34.
- Kintzios, S., Triatafyllou, M., Drossopoulos, J.B., 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatment of callus induction proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. Cereal Res. Commun. 24: 147-153.
- Litz, R.E., D.J.Gray, 1992. Organogenesis and Somatic Embriyogenesis. P.3-34. In: F.A. Hammerschlog and R.E. Litz (eds). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CABI, Univarsity Pres, Cambridge.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. Arevised Medium for Rapid Growth Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Phsysiol. Plant, 15, 473-479.
- Nas, M.N., 2003. Inclusion of Polyamines in the Medium Improves Shoot Elongation in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Micropropagation. Turk J Agric For. 28: 189-194.
- Oluk, E.A., Kaşkar, Ç., 2005. Somatic Embriyogenesis and Shoot Regeneration from Callus Cultures of Papaver somniferum L. cv. Office-95. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(2), 225-227.
- Öksüz, S., 1993. Doku kültürü yöntemiyle değişik besi ortamlarında beyaz zambak yetiştiriciliği. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 65 s.

- Özcan, S., Barghchi M., Firek S. ve Draper J., 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embriyogenesis in pea. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 11: 44-47.
- Özcan, S., Sevimay C. S., Yıldız, M., Sancak, C. ve Özgen, M., 1996. Prolific shoot regeneration from immature embriyo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), *Plant Cell Rep.*, 16: 200-203.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Repots* 18:331-335.
- Sancak, C., 1999. Koca Fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'in Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu, G. Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi 19: 25-33.
- Smith, R., 1992. *Plant tissue culture techniques and experiments*. Pp. 1-27, Academic Press Inc, UK.
- Soylu, A., Ertürk, Ü. 1999. Researches on Micropropagation of Chestnut. *Acta Hort.* 494: 247-253.
- Taner, G., Scott, K.J., 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*) *Plant Science*, 45: 119-124.
- Thorpe, T.A., 1981. *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis*. Department of Biology, University of Calgary, Alberta, Canada, 379p
- Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K.M., Mirici, S., ve Özcan, S. (2003) Adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17: 33-37.
- Vitanova, Z., Vitanov, V., Trifonova, A., Savova, D., Atasanov, A., 1995 Effect of 2,4D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley.
- Wawrzynczak, D., 1998. Shoot regeneration from in vitro leaf explants of five strawberry genotypes (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 6 (2), 63-71.
- Yalçın, T., Erenoğlu, B., Burak, M. 2003. Hayward (*A.deliciosa* Planch) Kivi Çeşidinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması. Ulusal Kivi Ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu: 85-90.
- Yıldız, M., Özcan, S., Er, C., 2001. Keten (*Linum usitatissimum* L.)'de Adventif Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Farklı Eksplant Kaynaklarının Etkisi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara.
- Yin S., Jin, W., Wang, P., Meng, F., Han, Z., 2003. Effects of thidiazuron (TDZ) on inducing adventitious shoot of strawberry in vitro. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 11 (4), 379-382.
- Zebrowska, J.I., Hortynski, J. 2002. Plant regeneration from leaf explants in strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). *Acta Horticulturae*, 567 (1-2), 313-315.
- Zhou, M. D., Lee, T. T., 1983. Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62, 1393-1397.
- Vitanova, Z., Vitanov, V., Trifonova, A., Savova, D., and Atasanov A. 1995. Effect of 2.4-D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Rize'de tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden 2007' de Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Kars Kağızman Tarım İlçe Müdürlüğünde Ziraat Mühendisi olarak görevine devam etmektedir.