T. C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMBRİYONİK KÜLTÜR YÖNTEMİYLE YETİŞTİRİLEN VE SOĞUKTA MUHAFAZA EDİLEN AYÇİÇEĞİ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BİTKİLERİNDE KARYOLOJİK VE ANATOMİK İNCELEMELER

Gökçe AKPINAR

Yüksek Lisans Tezi

T.Ü. FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

2006
EDİRNE

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMBRİYONİK KÜLTÜR YÖNTEMİYLE YETİŞTİRİLEN VE SOĞUKTA MUHAFAZA EDİLEN AYÇİÇEĞİ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BİTKİLERİNDE KARYOLOJİK VE ANATOMİK İNCELEMELER

GÖKÇE AKPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

2006

EDİRNE

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMBRİYONİK KÜLTÜR YÖNTEMİYLE YETİŞTİRİLEN VE SOĞUKTA MUHAFAZA EDİLEN AYÇİÇEĞİ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BİTKİLERİNDE KARYOLOJİK VE ANATOMİK İNCELEMELER

Gökçe AKPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez / / tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Murat TÜRKYILMAZ
(Jüri üyesi)

Yrd. Doç. Dr. Çiler MERİÇ
(Jüri üyesi)

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

Teşekkür……..……... iii
Özet iv
Abstract v

1. Giriş…….……... 1

2. Genel Bilgiler……. 2

2.1. Bitki Kültürleri……. 2
2.2. Embriyo Kültürü……..... 3
2.2.1. Embriyo kültürünün kullanım alanları …….…… 4
2.3. Muhafaza Yöntemleri……... 7
2.4 Germplazm Muhafazası…….……..……..... 7
2.4.1. Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması..... 8
2.4.2. Soğukta muhafaza ……..... 8
2.5. Çalışma Konusu İle İlgili Yapılan Çalışmalar……..…… 9
2.6. Bitki Hakkında Genel Bilgiler (*Helianthus annuus* L. (Ayçiçeği)) 19
2.6.1. Ayçiçeği üretiminin Dünya'daki durumu…….…….21
2.6.2. Ayçiçeği üretiminin Türkiye'deki durumu…….21
2.6.3. Ayçiçeği ıslahında güncel uygulamalar ve yakın gelecekte yapılacak çalışmalar…….…… 22

3. Materyal ve Metod…….…….23
3.1. Materyalin Elde Edilmesi……..…… 23

4. Bulgular……..……26
4.1. Morfolojik Bulgular ……26
4.2. Anatomik Bulgular ……..……33
4.3. Karyolojik Bulgular……..40

5. Tartışma…….…….50
Kaynaklar……..…….…….63
Özgeçmiş…….……...67
Şekiller ve Çizelgeler…….…..……68

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Verdiği desteği hiçbir zaman unutmayacağım. Biyoloji Bölümü imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Tülin AKTAÇ'a, tez çalışmalarım sırasında her türlü değerli yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Çiler MERİÇ ve Araştırma Görevlisi Dr. Necmettin GÜLER'e teşekkür ederim.

Bana her zaman maddi ve manevi destek veren aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bu çalışmada, *Helianthus annuus* L. (ayçiçeği) bitkisinden embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilmiş olan bitkilerin soğukta muhafaza edilerek korunmasına ve bu bitkilerde oluşan anatomik ve karyolojik değişimlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Çalışma materyali olarak kullanılan ayçiçeği tohumları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır. Çalışmalar, Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma, deney ve kontrol grubu olacak şekilde yapılmıştır. Kontrol grubu bitkileri kum ortamında çimlendirilerek elde edilmiştir. Deney grubu bitkileri ise, MS besi ortamında embriyo kültür yöntemiyle yetiştirilen bitkiler ve bunların bir kısmının düşük ısıda muhafaza edilmesiyle elde edilen bitkilerden oluşmuştur. Yapılan anatomik değerlendirmede, deney grubu bitkilerinin epiderma, korteks parankiması, parankima, iletim demetleri gibi yapılarının kontrol grubuna göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Mitotik indeks değerleri kontrol grubunda %22.98, deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde %60.00, soğukta muhafaza edilmiş bitkilerde ise %10.15 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Helianthus annuus* L., ayçiçeği, doku kültürü, embriyo kültürü, mitotik indeks.

ABSTRACT

In this study, plants which were obtained by applying embryo culture method to the *Helianthus annuus* L. plants, were tried to protect in cold and tried to determine anatomical and caryological changes in the plants. The sunflower seeds that were used in work, were supplied from Trakya Agriculture Research Institue. All works were done in Trakya University Faculty of Art and Science Biology Department Tissue Culture Laboratory. The work was performed in two groups: Experiment and Control. Control group was obtained by turfing plants in the sand medium. On the other hand experiment group was consisted of plants that were grown by the method of embryo culture in MS medium and plants which were grown up either at the low temperature and by the method of embryo culture. In the anatomical discussion, it is seen that, plant parts such as epidermis, cortex parenchyma, parenchyma, vascular bundles show disparities in the control and experiment group. Also mitotic index value was determined: %22.98 in the control group plants, %60.00 in the experiment group plants and %10.15 in the plants that were grown in cold.

Key words: *Helianthus annuus* L., sunflower, tissue culture, embryo culture, mitotic index.

1. GİRİŞ

Bitki doku ve hücre kültürü son yıllarda araştırma amaçlı ve üretim amaçlı olmak üzere kullanımı artmış bir yöntemdir. Bitki kültürlerinin geçmişi insanlık tarihi kadar eskidir. İlk zamanlarda insanlar bitkilerin yabani formlarından faydalanırken daha sonra nüfus artışına bağlı olarak beslenme ihtiyaçlarının artması nedeniyle yabanilerin içinden iyileri seçilerek, tarımsal üretimleri yapılarak ilk kültür çalışmaları başlamıştır.

Bitki doku kültürü, genetik çeşitlilik oluşturmak ve mevcut çeşitlerden daha iyi özellikte bitkiler üretmek için kullanılır. Bilinen diğer yöntemlerden farklı olarak doku kültürü, bitkinin çeşitli kısımlarından kesitler alınan ve eksplant adı verilen parçanın sterilize edildikten sonra steril ve kapalı bir besin ortamında uygun ışık ve sıcaklıkta kültüre alınması, organogenez, embriyogenez veya kallus dokusu oluşumu ile bitkinin meydana gelmesi işlemidir. Eksplant olarak kök, gövde, yaprak, çiçek, üreme organları kullanılabilir. Doku kültürü yöntemlerinde bitkisel hücrelerin totipotensi özelliğinden faydalanılır. Doku kültürü yöntemlerinden yararlanarak, meristem kültürleri, kallus kültürleri, haploid kültürler, süspansiyon kültürleri, protoplast kültürleri hazırlanıp bitkilerin çoğaltılması, genetik varyasyonların ortaya çıkarılması, istenilen özelliklerde elde edilen bireylerden yeni bireyler üretilmesi sağlanabilir.

Bitki doku kültürü çalışmaları günümüzde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Birinci amaç, doğadaki bitkileri insanların yararına daha elverişli hale getirmektir. Bu amaçla günümüzde, tohumla üretimi zor olan türlerin kültür ortamında çoğaltılması, üreme periyodu uzun olan türlerin kısa sürede üretimi, özellikleri bakımından üstün olan türlerin üretimi, haploid bitki üretimi, bitkilerin belirli aşamada muhafazası gibi çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada, *Helianthus annuus* L. bitkisinden embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilen bitkilerin düşük ısıda muhafazası ve bu yöntem sonucunda bitkilerde oluşabilecek anatomik ve karyolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitki Kültürleri

Bitki doku kültürü; steril şartlarda, yapay besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesi amacıyla yapılan çalışmaları kapsar (Babaoğlu vd., 2001).

Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bitki kültürleri gelişimlerine göre klasik kültürler, su ve kum kültürleri, hücre ve doku kültürleri, olarak üç ana gruba ayrılabilir (Kocaçalışkan, 2002).

Klasik kültürler bitki kültürlerinin en eski yöntemlerini kapsar. Önemini yitirmeyen bu yöntem günümüzde de kullanılmaktadır. Bitkilerin kültüründe kullanılan generatif ve vegetatif çoğaltma klasik kültür yöntemleridir. Generatif çoğaltmada tohum ile üretim yapılmaktadır. Genellikle tahıl bitkileri tohumla üretilirler, meyve ağaçları ise daha çok vegetatif yöntemler ile üretilirler (Kocaçalışkan, 2002). Bitkilerde vegetatif üretim, daldırma, çelikle üretim, aşılama, kök sürgünleriyle üretim, soğan ve yumru ile üretme yöntemleriyle yapılır.

Bitklerin klasik kültürlere göre daha kontrollü şartlarda çoğaltılması su ve kum kültürleri ile yapılır. Su ve kum kültürü metodları 19. yy.da geliştirilmiştir. Bitkisel üretimde kullanılan su ve kum kültürleri doku kültürüne geçiş gibi düşünülebilir. Su kültürlerinde bitkinin gelişimi için gerekli maddeler saf su içerisinde çözülerek, hazırlanan ortama bitkinin kökleri girecek şekilde monte edilerek yetiştirilir. Kum kültüründe ise minerallerden arındırılmış kumlu ortama bitkinin ekilerek besin

çözeltisiyle sulanmasıyla üretim sağlanır. Su ve kum kültürleri yöntemleri bitkilerin laboratuvar ortamında da üretilmesine imkan vermektedir (Kocaçalışkan, 2002). Klasik kültürler ile su ve kum kültürü yöntemlerinin yerini artık hücre ve doku kültürü metodları almaktadır. Çünkü doku kültürleri tamamen kapalı kaplar içinde, steril ve tam kontrollü şartlarda yapılmaktadır.

Bitki doku kültürleri temelde bir üretim yöntemidir. Bu konuyla ilgili çalışmalara mikroskobun keşfi hız kazandırmıştır. Bundan sonraki gelişme ise Schwann'ın ortaya attığı hücre teorisiyle gelişme göstermiştir. Bu teoride Schwann, hücrelerdeki totipotensi kavramını açıklamıştır. Bu kavrama göre çok hücreli bir bitkisel organizmanın her bir canlı hücresi uygun çevresel şartlar sağlandığında, bağımsız gelişme gösterebilir ve rejenerasyonla yeni bir bitkiye dönüşebilir (Akçam Oluk ve Demiray, 2001). Bitki doku kültürü de esasen, bitkisel organizmaların sahip olduğu totipotensi yeteneklerinden faydalanılarak yapılır.

2.2. Embriyo Kültürü

Yüksek bitkilerin tohumlarından izole edilen embriyonun uygun medyumlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak adlandırılır. Embriyo kültürü ile bitki ya doğrudan embriyodan, ya da önce kallus oluşumu ve takiben sürgün ve kök oluşumu ile oluşabilir. Embriyo kültürü çeşitli amaçlar için kullanılır. Bitki embriyo kültürü ile ilgili ilk çalışma Hanning tarafından 1904 yılında *Raphanus* ve *Cochlearia'*nın tohumlarından olgun embriyoların mineral tuz ve şeker içeren basit bir ortamda kültüre alınması ve bitkicik geliştirilmesi şeklinde yapılmıştır. 1924 yılında Dieterich tarafından mısır bitkisinde ilk embriyo kurtarma tekniği uygulanmıştır. Sonra olgunlaşmamış embriyoların kültürü ile ilgili çalışmalar da yapılmış ve kültüre alınan embriyonun gelişme dönemine göre kültür ihtiyaçları belirlenerek başarılı sonuçlar alınmıştır (Babaoğlu vd., 2001).

Embriyo kültürü kullanım amaçları olarak, tohum dormansisini ortadan kaldırmak, tohum canlılık testi, türlerin özelliklerinin belirlenmesi, üretilmesi zor olan hibrit bitkilerin ve haploid bitkilerin üretimi sayılabilir. Embriyo kültüründe önemli bir nokta ise embriyo için değişik oranlarda büyüme düzenleyicilerinin kullanıldığı uygun medyumu belirlemektir (Bürün ve Poyrazoğlu, 2002).

Olgun embriyolardan kültür daha kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır. Olgunlaşmamış embriyolardan kültür ise daha zordur (Babaoğlu vd., 2001).

Embriyo kültüründe embriyo ne kadar erken safhada kültüre alınırsa geliştirmesi o derece zor olur. Çünkü olgun embriyolar temel besin ortamında (sadece makro ve mikro besin elementlerinin bulunduğu ortamda) gelişebilirken, olgunlaşmamış embriyolar ise ilave besin maddelerine ihtiyaç duyarlar (vitamin, aminoasit, hormon vs.) (Kocaçalışkan, 2002).

Embriyo kültürü nesli tükenen bitki türlerinin tekrar kazandırılması, düşük sayıdaki orijinal tohumların arttırılması ve sürgün gelişimiyle kültürde bitki oluşumu için önemlidir. Böylece, embriyo kültürü ile üretilen yapılar mikroçoğaltım için materyal olarak kullanılabilir. Embriyo kültürü kullanılarak dormansi problemi bazı bitki türleri için sorun olmaktan çıkar ve bitki rejenerasyonu sağlanır (Üçler ve Mollamehmetoğlu, 2001).

2.2.1. Embriyo kültürünün kullanım alanları

Embriyo kültürü yöntemiyle embriyonik gelişimin evrelerinin incelenmesi ve bu evrelerdeki ihtiyaçların belirlenmesi çalışmaları yapılabilir. Ayrıca zor çimlenen tohumlar söz konusu olduğunda da tohum dormansisi ve tohum sterilitesi embriyo kültürü ile kırılabilmektedir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi embriyoyu çevreleyen

yapıda var olan kimyasal engelleyiciler veya mekaniksel dayanıklılık nedeniyledir. Böyle durumda embriyoların izole edilip besin ortamında kültüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyuşmazlığı nedeni ile olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kültürü ile canlı fideler elde edilmektedir. Çimlenme için parazitlerin gerekli olduğu durumlarda da in vitro'da parazite gerek olmadan da çimlenme gerçekleşebilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Örneğin, ticari muzun yabani bir akrabası olan *Musa balbisiana* tohumları doğada çimlenmemektedir. Bununla birlikte fideler embriyoların kültüre alınması ile kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bazı hindistan cevizlerinde sıvı endosperm yerine yumuşak ve yağlı bir doku gelişmektedir. Bu tip hindistan cevizleri "makapuno" olarak adlandırılmaktadır ve bunların tohumları normal koşullar altında çimlenmede başarısız olmaktadır. İn vitro kültür tekniği kullanılarak makapuno embriyolarından bitkicikler yetiştirilmiştir. Bu yolla embriyo kültürü ile elde edilip tarlada yetiştirilen bitkilerin %85'inde makapuno cevizlerine rastlanmıştır (Bhojwani ve Razdan, 1996).

Bir diğer kullanım alanı ıslah sürecinin kısaltılmasıdır. Bahçe bitkilerinde nadiren de olsa ıslah çalışmaları tohumların dormansi periyotları nedeniyle uzamaktadır. Embriyoların besin ortamında geliştirilmesi ile bu süre kısaltılabilmektedir. Dormansiye sebep olan faktörler, tohum kabuğu ve endospermdeki endogen inhibitörler, düşük sıcaklık, özel ışık gereksinimleri gibi faktörler embriyonun kültüre alınması ile giderilmektedir. Sert tohum kabuğu nedeniyle çimlenmenin geciktiği durumlarda da embriyo kültürü ile çimlenme hızlandırılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Olgun olmayan embriyoların izolasyonu ve kültürü ile de ıslah programı kısaltılmaktadır. Örneğin, *Iris* (Süsen) tohumları birkaç yıl süren bir dormansi periyodu geçirmektedir. Embriyo kültürü kullanılarak irisin yaşam çemberi 2 veya 3 yıldan 1 yıla hatta 1 yıldan daha az süreye indirilmektedir. *Rosa* (gül) normal olarak bir yılda çiçeklenmeye ulaşmaktadır. Embriyo kültürü ile 1 yılda 2 jenerasyon üretilerek ıslah çemberinin kısaltılması mümkün olmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Malus türlerinde (dağ elması) toprağa ekilen tohumların çimlenmesi 9 ay almaktadır. Embriyo kültürlerinde ise çimlenme 48 saat içerisinde başlayıp, 4 haftada şaşırtılabilecek büyüklükte fideler elde edilmektedir. 5 ay sonunda fideler yaklaşık 1 metre yüksekliğe ulaşmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Soya ve ayçiçeğinde tohum olgunluğu dönemi, yaşam çemberinin (120–150 gün) %50-60'ını almaktadır. Ayçiçeğinin olgunlaşmamış embriyolarının in vitro kültürü yolu ile yaşam çemberi süresi yarıya indirilebilmiştir. Benzer olarak 7 ve 10-18 günlük embriyoların kültüre alınması ile ayçiçeğinde 1 yılda 4 jenerasyon alınabilmiştir (Babaoğlu vd., 2001).

Hibrit embriyoların yaşayamadığı durumlarda uzak akraba olan türler arası melezler çoğunlukla başarısızdır, döllenme olmakla beraber hibrit embriyonun yaşamadığı görülmektedir. Bu duruma embriyo düşmesi veya abortus denilmektedir. Bunun sebeplerinden biri endospermin gelişmemesi veya dejenere olmasıdır. Bu durumda embriyo beslenemediğinden dolayı ölür ve kültüre alınması ile yapay besin ortamı endospermin yerine geçebilmekte böylece hibrit embriyolar yaşatılmaktadır. Bu şekilde elde edilen hibrit melezler tarımsal üretimde yoğun olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Embriyo kültürü ile haploid bitkilerin üretilmesi de sağlanabilir. Uzak türler arası veya cinsler arası melezlemelerde döllenmeden sonra melez embriyonun gelişmesi sırasında ebeveyinlerden birine ait kromozomların embriyonu yolu ile haploidlerin üretimidir. *Hordeum vulgare x H. bulbosum* melezinde döllenme kolayca olur fakat *H. bulbosum*'un kromozomları embriyogenesisin ilk birkaç bölünmesi süresince kaybolur. Bu nedenle gelişen bitkiler haploid *vulgare* bitkileridir. Bunların kromozom sayıları çeşitli uygulamalar ile iki katına çıkarılarak double-haploid (DH) bitkiler ve bunlardan DH hatlar elde edilmektedir. Aynı teknikle buğday x mısır ve buğday x sorgum melezlerinden haploid buğdaylar; yulaf x mısır melezlerinden de haploid yulaf bitkileri elde edilmiştir. "Bulbosum" tekniği adı altında belirtilen bu yöntem arpa ıslahında kullanılmaktadır (Emiroğlu ve Gürel, 1993).

2.3. Muhafaza Yöntemleri

Bitkisel organizmalarda doku kültürü yöntemiyle yapılan çoğaltım işlemleriyle bağlantılı olarak elde edilen hücre veya fidelerin bu aşamalarda muhafaza edilmesi son yıllarda kullanımı artan bir uygulamadır. Tohum muhafazası bazı yönleriyle yeterli olamamaktadır. Fakat bu yöntemlerin kültür yöntemiyle yapılması birçok avantaj sağlar. Tohumlar germplazm muhafazasıyla korunur.

Kültürü yapılan bitkinin geliştirilebilmesi için çeşitli kaynakların ve tohumların elde bulundurulması veya muhafazası, son yıllarda gıda güvenliği bakımından da önem kazanmıştır. Çünkü bazı çeşitlerin üretim alanlarında monokültür olarak artışı ve hızla çoğalmasından dolayı, kültürü yapılan bazı bitkiler ve onların yabani akrabaları kaybolma tehlikesi ile yüz yüzedir. Bu yüzden uzun yıllar tohumların canlılıklarının ve genetik yapılarının bozulmadan muhafaza edilmeleri (germplazm muhafazası) gerekmektedir. Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germplazm muhafazası çalışmaları 1990'lı yıllarda kullanılmaya başlamıştır (Babaoğlu vd., 2001).

2.4. Germplazm Muhafazası

Totipotent hücrelerin in vitro kültürü, kallus veya süspansiyon hücreleri şeklinde uzun süreli olarak veya belirli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilir. Alternatif olarak ilgili hücreler, meristemler veya elde edilen minyatür bitkiler düşük sıcaklıkta (4 ^{0}C), çok az besin maddesine ve alana ihtiyaç göstererek steril şartlarda saklanabilir (1–4 yıl). Benzer şekilde çok düşük sıcaklıklarda, sıvı azot içinde doku ve hücreler hızlı bir şekilde dondurulup saklanabilirler. Bu doku kültürü teknikleri in vitro germplazm muhafazasında önemlidir ve gen ve tohum bankalarında alternatif olabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Muhafaza şekilleri çeşitli yöntemlere sahiptir. Bunlar muhafaza etme ve kullanım amacına uygun olarak; muhafaza yerine, bitki çeşidine, materyalin yapısına ve genetik kompozisyonuna uyan en geçerli yöntem olarak seçilirler. Germplazm muhafazasında bugün iki temel yöntem uygulanmaktadır.

2.4.1. Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması

Yavaş ya da azaltılmış büyütme ile muhafazanın esası, bitki kültürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kültür ortamının ve kültür koşullarının değiştirilmesine dayanır. Değiştirilmiş koşullarda büyüme oranı, oldukça düşük olmaktadır. Böyle bir uygulamanın başlıca avantajı ise görünebilir kültür bozulmasının kolayca fark edilebilmesidir. Bu sayede canlılık kaybından kaçılabilir, çeşitlere patojen testi uygulanabilir ve dolayısıyla materyal uluslar arası değişime açılabilir. Yavaş büyütme ile muhafaza; farklılaşan kültürler, bitkicik ya da bitki sürgünlerinde yaygın olarak uygulanırken, farklılaşmayan kültürler, kallus ve süspansiyon kültürlerinde ise daha az uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

2.4.2. Soğukta muhafaza

Soğukta muhafaza terimi, bitki örneklerinin dakikada birkaç ^{0}C, kademe kademe soğutularak muhafazasını ifade eder. Genellikle örnekler dakikada 30 – 40 ^{0}C soğutulur ve sonra sıvılaştırılmış gazlara (çoğunlukla sıvı azota N_2(g)'e) daldırılarak depolanırlar. Büyüme ve biyosentetik güçler bu işlemlerden ekilenmezler. Üretim işlemlerinde kullanılmadan önce örnekler, uygun bir çözündürme işleminden geçirilmelidir. Bu

aşamada, dondurmanın olabilecek olumsuz etkisine rağmen, hücreler güçlü donanımlarıyla ve çözündürme işlemleriyle muhafaza edilirler (Babaoğlu vd., 2001).

2.5. Çalışma Konusu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Farklı besin ortamlarında ve farklı hormon konsantrasyonlarında çeşitli kültür tiplerinin verimlilikleri araştırılmıştır.

Yonca bitkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada en fazla sürgünün BAP (6-benzylaminopurine) ve NAA (Naftalen asetik asit) içeren ortamlardan elde edildiği belirtilmiştir (Özgen vd., 1997).

Yapılan bir başka çalışmada da, in vitro şartlarda arpada olgunlaşmamış embriyoya etki eden çeşitli faktörler araştırılmış ve en iyi sonucun MS (Murashige ve Skoog) besiyerinde alındığı kanıtlanmıştır (Gu vd., 1990).

Diğer bir çalışmada *V. vinifera* kalitesinde meyve ve *V. rotundifolia* düzeyinde hastalık ve zararlılara toleranslı bitkiler elde etme amacıyla yapılan melezlemelerde, embriyo aborsiyonundan kaynaklanması muhtemel yetersiz üretimin arttırılmasında embriyo kültürünün mümkün olduğu belirtilmiştir (Goldy vd., 1989).

Bezelye ile yapılan bir çalışmada, sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi, genotip ve ortamda bulunan büyümeyi düzenleyicileri olduğu belirtilmiştir (Natalini ve Cavallini, 1987).

Emriyo kültürü ile ilgili diğer bir çalışmada, arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nın olgun embriyolarının kültüründe besi ortamı bileşimi ve sterilizasyon yönteminin etkisi üzerinde durulmuştur. Kullanılan besin ortamları içerisinde embriyodan bitkicik gelişiminin en yüksek Randolph-Cox ortamında elde edildiği ve bunu sırasıyla MS, ½ MS ve B5 ortamlarının izlediği belirtilmiştir. Araştırılan sterilizasyon yöntemlerinden sodyum hipoklorit ile sterilizasyonu antibiyotik solusyonu ile muamele etme ve $HgCI_2$ ile yapılan sterilizasyon daha etkili bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda, embriyo gelişimleri üzerine farklı konsantrasyon etkileri araştırılmış ve genellikle MS ve B5

besiyerlerinin arpa embriyo kültüründe kullanıldığı gösterilmiştir (Bürün ve Poyrazoğlu, 2002).

Bir başka çalışmada ise *Avena sativa* L. da olgun embriyolardan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu incelenmiş olup kallus oluşturmada olgun embriyolardan yararlanılmıştır. Yulaf bitkisinde olgun embriyolardan kallus oluşumunun kültüre alındıktan 3 gün sonra başladığı ve kallus oluşumunun genotipe bağlı olduğu görülmüştür (Birsin vd., 2001).

Diğer bir çalışmada, Türkiye'de ekonomik öneme sahip Batı Anadolu endemiklerinden olan *Thymus sipyleus* Boiss'in (baharat) in vitro çoğaltılması araştırılmıştır. Sterilize edilmiş bitki tohumları modifiye edilmiş MS besi ortamı ve Heller besi ortamlarında çimlendirilmiştir. En iyi çimlenmenin modifiye MS ortamında gerçekleştiği, ancak bitkinin sonraki gelişmesi için ise Heller ortamının uygun olduğu görülmüştür. *Thymus sipleus*'un sekonder metabolit içermesi ve gelişim sürecinde bunları ortama salgılaması sonucu kendine toksik etki yapması Heller besi ortamı kullanılarak engellenmeye çalışılmıştır. NAA ve BA (6- Benzil adenin) ilaveli MS temel ortamına aktarılan fideler ortamla temas ettikleri noktalardan kallus oluşturmuşlardır. Yine aynı ortamda rejenere olan bitkiciklerin, 2 hafta sonra çoklu sürgün halini aldığı ve 4. alt kültür sonunda aynı ortamda köklendiği görülmüştür (Erdağ ve Yürekli, 2000).

Kaempferia galanga L. bitkisinin yaprak tabanı eksplantlarından kallus kültürü ile somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksplant olarak kullanılan yaprak kını parçalara ayrılarak agar-jel medyumuna gömülmüştür ve MS medyumunda kültüre alınmıştır. Yüksek oranda kallus üretiminin MS medyumunda sağlandığı görülmüştür. En iyi kallus oluşumu 7 hafta sonra gözlenmiştir. Daha sonra aynı medyumda alt kültürler ile bitki gelişiminin gerçekleştiği ve bitkilerin bu işlemlerden sonra toprağa aktarıldığı belirtilmiştir (Rahman vd., 2004).

Diğer bir çalışmada, ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) etkin bir bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi araştırılmıştır. Ayçiçeği hücre veya dokularından etkin bitki rejenerasyon sistemi geliştirmek amacıyla, farklı eksplant tipleri ve hormon kombinasyonlarının kullanıldığı değişik rejenerasyon protokolleri karşılaştırılmıştır. Özellikle alt (bazal) kısımlardan olmak üzere, kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde edilmiş, fakat genotipik varyasyonun hem somatik embriyo hem de

kök üretimi için en kritik faktör olduğu gözlenmiştir. Somatik embriyo üretimini arttırmak amacıyla kültür şartlarının geliştirilmesi gerekli görülebilir sonucuna varılmıştır (Gürel ve Kazan, 1998).

Diğer bir çalışmada ise Bangladeş'te ki bazı önemli şekerkamışı çeşitlerinin in vitro mikroçoğaltımı üzerinde durulmuştur. İn vitro şartlarda besiyerine eklenen büyüme düzenleyicilerinin kallus üretiminde, sürgün farklılaşmasında ve kök oluşumunda etkili olduğu görülmüştür. Kök oluşumunda en iyi sonucun modifiye MS besiyerine eklenen oksin ile gerçekleştiği görülmüştür (Mamun vd., 2004).

Büyük yapraklı ıhlamur (*Tilia platyphyllos* Scop.)'un in vitro koşullarda embriyo kültürü ile bitki rejenerasyonu ve tomurcuklarının çoğaltılması için *Tilia platyphyllos*'un olgun tohumlarından izole edilen embriyolar farklı şeker, BAP (6-benzylaminopurine) ve Kinetin dozlarının eklendiği MS ortamında kültüre alınmış ve bu ortamların in vitro koşullarda embriyo gelişimi, bitkicik oluşumu ve tomurcuk oluşumuna olan etkileri araştırılmıştır. Denemeler sonucunda, bitki büyüme düzenleyicileri bulunmayan, sadece şeker ilave edilen ortamlarda embriyolar epikotil ve kök farklılaşması gerçekleştirerek bitkicik oluşturmuştur. En etkili şeker dozu 30 g/L olarak bulunmuştur. Epikotil eksplantları üzerinde tomurcuk oluşumu bakımından 1.0 mg/L BAP dozu diğer dozlara göre daha etkili bulunmuştur. Tomurcuk oluşumu bakımından denenen tüm BAP (6-benzylaminopurine) dozları, kinetin dozlarına göre daha etkili olmuştur. 30g/L şeker eklenerek farklı tarihlerde kültüre alınan embriyolarda hipokotil ve kök uzunluğu bakımından en iyi gelişme tohumların toplanmasından yaklaşık 1 ay sonra kültüre alınan embriyolarda gerçekleşmiştir. Araştırma sonuçlarında, olgun ıhlamur tohumu embriyolarının şekerli ortamlarda çimlendirilerek bitki elde edileceği ve buradan elde edilen bitki epikotillerinin kültüre alınmasıyla tomurcukların çoğaltılabileceği gösterilmiştir (Üçler ve Mollamehmetoğlu, 2001).

Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen salep orkidelerinden *Ocrhis anatolica* Boiss, *Orchis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophyrs phrigra* Fleischm, et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum afine* türlerinde embriyo kültürü kullanılarak in vitro'da kültüre alınmışlardır. Salep embriyolarının kültüre alınmasında 14 farklı ortam kullanılmıştır. En yüksek ortalama çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranları sırasıyla %2.39 ve %1.86 olarak Vaes Debergh + Domates Ekstratı 4 Aktif Karbon ortamında bulunmuştur. Bu çalışmada, salep

orkidelerinin in vitro koşullarda çoğaltılmaları ve yumru oluşturma oranlarının araştırılarak doğal koşullarda çoğalması oldukça sınırlı olan bu bitkinin üretilmesinde alternatif bir yöntem belirlenmeye çalışılmıştır (Çağlayan vd., 1998).

Başka bir çalışmada ise, embriyo kültürü tekniğinin çekirdeksiz üzüm ıslahında kullanılabilme olanaklarının ortaya konması amacıyla çekirdeksiz x çekirdeksiz üzüm melezlerinden embriyo kültürü kullanılarak bitki elde edilmesi planlanmıştır. Araştırmada Sultani çekirdeksiz, Ergin çekirdeksizi, 3A- 261, Perlette, Pembe çekirdeksiz, 2B- 56, Flame Seedless ve King's Ruby çekirdeksiz üzüm çeşitleri kullanılmıştır. Birinci yılda çeşitlerin çiçek tozu kalite ve üretim miktarları saptanmıştır. 2. yılda ise Çekirdeksiz x Çekirdeksiz melezlerinden embriyo kültürü yoluyla bitki eldesine çalışılmıştır. İncelenen çeşitlerin tamamının tozlayıcı bir çeşitte olması gerektiği kadar çiçek tozu canlılık ve çimlenme kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Melez kombinasyonlardan embriyo kültürü yoluyla bitki elde edilmesi de başarıyla gerçekleşmiştir. Embriyolardan 2,5 gün ile 9 gün gibi kısa sürede ve %77,1'in üzerinde bir çimlenme saptanmıştır. Çimlenen embriyolardan %78.9'unun tam bitkiye dönüştüğü belirtilmiştir (Tangolar vd., 1999).

Bazı çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin embriyo kültüründen yararlanılarak çoğaltılması ile ilgili diğer bir çalışmada, Perlette, Flame, Seedless, Sultani çekirdeksiz, Pembe çekirdeksiz, 2B–56 ve King's Ruby çeşitlerinden, tam çiçeklenmeden itibaren, 3. ve 8. haftalar arasındaki sürede birer hafta aralarla tane örnekleri alınmıştır. Ovül ve embriyoların çimlenmesi üzerine M, Nitsch ve E20A besi ortamlarının etkisi incelenmiştir. Çimlenme oranları, çeşitlerin örnek alma zamanlarına ve kullanılan besi ortamına göre farklılık göstermiştir. Çekirdeksiz çeşit embriyolarından önemli miktarda bitki elde edilmiş ve bu tekniğin çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında kullanılabileceği saptanmıştır (Tangolar vd., 1998).

Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) bitkisinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltımı amaçlanan bir çalışmada, yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 6 farklı burçak hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenleri değişik oranlarda Thidiazuron (TDZ) içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında kültüre alınmıştır. TDZ konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan eksplantların oranı %90 ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı da 22 adet olarak belirlenmiştir. Burada eksplant başına en

yüksek sürgün sayısının benzilaminopurin (BAP) ve naftalenasetik asit (NAA) içeren MS ortamından sağlandığı görülmüştür. Gelişen sürgünlerin daha sonra, indol-3-bütürik asit (IBA) içeren MS ortamında köklendirildiği belirtilmiştir (Erdoğan vd., 2005).

İn vitro koşullarda ayçiçeğinin bitki oluşturma yeteneği ile ilgili bir çalışmada, ayçiçeğinin 20 faklı kısmından alınan kotiledonlar in vitro şartlarda büyüme faktörleri içeren iki kültür ortamında bitki oluşturma yeteneği gösterdiği görülmüştür. 4. haftada direkt organogenesis ile bitki oluşumunun başladığı belirtilmiştir. Tüm çeşitlerde medyumun etkisi saptanmıştır. Rejenerasyon kapasitesinin kültür medyumuna bağlı olduğu ve genotip ve diğer parametrelerin de bu değerleri etkilediği görülmüştür (Nestares vd., 2002).

Türkiye Trakya bölgesinde farklı türde hibrit ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nin in vitro şartlarda gelişimi ve kallus oluşum verimiyle ilgili yapılan çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen 16 farklı hibrit ayçiçeği kullanılarak üç farklı metod uygulanmıştır. Birinci metodta testa ayrılmadan, ikinci metodta ise testa ayrılarak yüzey sterilizasyonu yapılmış ve çimlenme gerçekleştirilmiştir. Üçüncü metodta çimlenme, testa çıkarılmadan nemli pamuk ortamında gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmaları, değişik hormon konsantrasyonlarındaki çeşitli medyumlarda var olan örneklerden alınan eksplantlar kullanılarak yapılmıştır. İstenilen sonuçlar kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılarak yapılan kültürlerden alınmıştır. Bu eksplantlardaki bölümler incelenip rejenerasyon ve kallus üretiminin yerli ve hibrit türlerde farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Arda, 2004).

Abies cilicica Carr. ve hibrid *Abies cilicica* × *Abies nordmanniana*'nın somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu konulu çalışmada, somatik embriyogenesis *Abies cilicica* Carr. ve hibriti *A. cilicica* × *A. nordmanniana* 'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarında 5μM benzilaminopürin kullanılmış ve hazırlanan Schenk ve Hilderbrant (SH) besiyerinde oluşmuştur. Somatik embriyo olgunlaşması için MS ve SH besiyerlerine %4 maltoz ve %10 polietilen glikol–4000 kullanılmıştır. Olgunlaşma için 80 μM absisik asit etkili olmuştur. Üç hafta sonra olgunlaşan embriyoların %1 sükroz ve %1 aktif kömür içeren SH besiyerinde çimlendiği ve bitkicikle birlikte kotiledon, hipokotil ve radikulaların oluşmaya başladığı görülmüştür. Bu çalışmada, *A.cilicica* ve hibritlerinin somatik embriyogenesis yoluyla somatik embriyolarının olgunlaşması ve bitki rejenerasyonunun gösterilmesi amaçlanmıştır (Vookova ve Kormutak, 2003).

Virüssüz bitki eldesi için patateste (*Solanum tuberosum* L.) meristem kültürü uygulanarak yapılan çalışmada, etkili üç tip oksin NAA (Naftalen astek asit), IAA (İndol asetik asit) ve IBA (İndol bütirik asit) farklı oranlarda kullanılmıştır. Maksimum bitki yüksekliği 8.3 cm, yaprak miktarı 8.9 olarak 0.5 mg NAA, 1 mg IBA'da gözlenmiştir. En uzun kök 4.2 cm olarak 1 mg IAA konsantrasyonunda görülmüştür. Test sonuçlarında bütün bitkilerin sadece PVX virüsü hariç diğer bütün virüs türleri bakımından negatif olduğu görülmüştür (Zaman vd., 2001).

İn vitro kültürde ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) olgunlaşmamış zigotik embriyolarının kallus oluşumuna karşı embriyogenesis oluşturması ve bitki büyüme düzenleyicilerinin rolünün incelenmesiyle ilgili çalışmada, ayçiçeğinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarından in vitro şartlarda somatik embriyo ve sürgün oluşumunun kültür medyumunda sükroz konsantrasyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Medyum %3 sükroz içerdiğinde sadece sürgünler oluşmuş, %12 sükroz içerdiğinde ise somatik embriyolar oluşmuştur. Bu farklılıkların eklenen büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarına bağlı olmaksızın, oluşan bütün morfogenetik değişikliklerin besiyeri içeriğindeki hormonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir (Charriere ve Hahne, 1998).

Tropikal Asya'da meristem kültürü ile yumru köklü virüssüz patates eldesi ile ilgili çalışmada, in vitro şartlarda virüssüz bitki eldesi için apikal meristem kullanılmıştır. Meristem değişik tipte ve konsantrasyonda hormon ilave edilen MS ve MS_0 besiyerlerinde sürgün ve kök oluşumu için kültüre alınmıştır. Farklı büyüme düzenleyicileri arasından 0.5 mg/L GA_3 + 0.04 mg/L KIN meristemin ilk aşaması için en iyi olarak bulunmuştur. İlk gelişen meristem MS_0 besiyerinde ve BA (6- Benzil adenin) ve IBA (İndol bütirik asit) içeren MS besiyerinde alt kültüre alınmıştır. IBA 'nın sürgün ve kök gelişiminde etkili olduğu görülmüştür. GA_3' ün sürgün oluşturmada en etkili besiyeri olduğu görülmüş olup kök oluşumundan sonra bitkilerin başarılı şekilde dış ortama aktarıldığı ve her birinin gelişimlerinin normal ve virüssüz olduğu belirtilmiştir (Nagip vd., 2003).

Embriyonik kallus üretimi için olgunlaşmamış buğday embriyoları kültürü ile ilgili çalışmada, embriyonun üç gelişim aşamasında 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) konsantrasyonunun buğday olgunlaşmamış embriyo kültürünün morfogenesisi üzerine etkileri araştırılmıştır. 2 mg/L 2,4-D'nin embriyogenesise etkisi olan

morfogenesis için en iyi oran olduğu ve kallusun birinci ve ikinci gelişim aşamasında 2 mg/L 2,4-D kosantrasyonunda oluştuğu görülmüştür. Yüksek embriyogenik kallus üretimi MS+B5 besiyerinde gözlenmiştir. Bu nedenle, buğdayda embriyogenik kallus üretimi için birinci ve ikinci gelişim aşamasının 2 mg L 2,4-D konsantrasyonunda uygun olduğu görüşüne varılmıştır (Haliloğlu, 2002).

Helianthus annuus' un zigotik embriyolarının in vitro ortamda kültürü ile adventif sürgün ve somatik embriyo oluşumu ile yapılan araştırmada, ayçiçeğinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarının aynı tip hücrelerinden sürgün oluşumunun ve somatik embriyo gelişiminin kullanılan medyumdaki şeker konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür (Charriere vd., 1999).

Delonix regia (Boger)'da somatik embriyo üretimi, *Delonix regia*'da somatik embriyogenesis, olgunlaşmamış tohumların kültürüyle başarılmıştır. 2,4-D ve 6- BA içeren iki kültür medyumu oluşturulmuştur. İşaretli olgunlaşmamış zigotik embriyolar, olgunlaşmamış tüm tohumlar, yarısı kesilmiş olgunlaşmamış tohumlar olmak üzere üç farklı eksplant kullanılmıştır. Kültürün başarıyla gerçekleştiği, kallusun, medyum ve eksplant tipine göre oluşum gösterdiği görülmüştür (Myers, 2004).

Çimlenen *Zea mays* L. tohumlarının sürgün apikal meristeminden bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörler ile yapılan araştırmada, mısır tohumlarının apikal eksplantlarından çoklu sürgün kültürünün rejenerasyonunda, kültür ortamının, çevrenin ve genotipik faktörlerin etkileri araştırılmıştır. Fideler için sürgün gelişim frekansı en yüksek 4–5 cm boyunda olduğunda bulunmuştur (Li vd., 2002).

Oregano (*Orıganum vulgare* × *applii*)' nun meristem uçlarının mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmada, mikroçoğaltım için sterilizasyon süresince sürgün uçlarına zararın azaltılmasıyla ilgili bir yöntem geliştirilmiştir. Yeşil tipine oranla basit sürgün kısımları daha hassas bulunmuştur. İn vitro ortamda gelişen genç bitkilerden alınan meristemler kültür süresince dış ortamda yetişenlere oranla az oksidasyon yapmışlardır. Büyüme düzenleyicilerinden BA ve NAA' in çeşitli konsantrasyonlarının *O. vulgare* × *applii'* nin mikroçoğaltımı üzerine etkileri araştırılmıştır (Goleniowski vd., 2003).

Tehlike altındaki odunsu türlerden, *Maclura tinctoria*'nın kallus kültüründen bitki rejenerasyonu ile yapılan çalışmada, bazı doğal türlerden dormansi periyodu ile birlikte düşük frekanslı çimlenme özelliğinde tohumlar üretilmiştir. Bu özellikler, seksüel çoğaltıma bağlı yeni fenotiplerin oluşumunu zorlaştırmıştır. *Maclura tinctoria*

düşük frekanslı tohum çimlenmesi ve odunlarının yaygın olarak kullanımı nedeniyle tehlike altında kalmıştır. 10.74 μM NAA + 4.43 μM BA içeren odunsu bitki medyumu (WPM) kullanılarak nod segmentlerinden kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Yüksek frekansta sürgün oluşumu 4.03 μM NAA + 4.43 BA içeren WPM besiyerinde görülmüştür. Kök oluşumunda ise, IBA ve aktif kömür etkili olduğu görülmüştür (Gomes vd., 2003).

Vetiver (*Vetiveria zizanioide* Nash)'in kallus kültürü ile bitki rejenerasyonunda amaç, germplazm kaynağından vetiver'in hücre süspansiyon kültürünü ve kallus vb. kültürlerden etkin bitki rejenerasyonunu sağlamaktır. Optimum hücre çoğalması 10 μM 2,4-D ve 10μM prolin içeren sıvı N_6 medyumunda görülmüştür. Hücre süspansiyonunun katı MS besiyerine aktarıdığında koloni oluşturduğu gözlenmiştir. Son olarak yeni besiyerine aktarmada %65 oranında bitki oluşumu gözlenmiştir (Prasertsongskun, 2003).

Anthurium andreanum bitkisinin rejenerasyonu ile ilgili çalışmada, etkin rejenerasyon sistemi oluşturmak için tohumlar 2.2 μM BA içeren medyumda çimlendirilmiştir. İki hafta sonra, tohmların %74'ünün çimlendiği görülmüştür. Dört hafta sonra bu bitkicikten alınan küçük parçalar 4.4 μM BA ve 0.05 μM NAA içeren medyumda alt kültüre alınmıştır. Herbir eksplantta sürgün oluşumu gözlenmiştir. Çimlenen tohumların dört haftalık in vitro bitkisi ile küçük parçacıklardan oluşan bitkicikler kallus oluşumu göstermiştir. Bu dokular 8.9 μM BA ve 2.7 μM NAA içeren besiyerinde alt kültüre alınmıştır. Altı hafta sonra kallusların geliştiği ve toprağa aktarılanlardan %80'inin gelişme gösterdiği gözlenmiştir (Vargas vd., 2004).

Keten (*Linum usitatissimum* L.) hipokotil eksplantlarında yaralanan yüzeyin arttırılması kallustan gelişen sürgün frekansını yükseltmiştir. Bu araştırmada, keten bitkisinin hipokotil eksplantlarında, epidermis tabakası soyularak yaralanan yüzeyin genişletilmesi ile *Agrobacterium* inokulasyonundan sonra transgenik olmaya aday sürgün frekansının arttırılması amaçlanmıştır. Soyulmamış hipokotil eksplantlarında kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki sürgün sayısı sırasıyla 0.8 g, %40, 4.24 adet ve 16.96 adet olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, epidermis tabakası soyulduğunda, kallus ağırlığının, sürgün oluşturan hipokotil yüzdesinin, eksplant başına sürgün sayısının ve petrideki

sürgün sayısının sırasıyla 1.35 g, %58.75, 8.15 adete ve 47.88 adete yükseldiği görülmüştür (Yıldız ve Er, 2002).

Diploid Diyarbakır karpuzu (*Citrullus lanatus* cv. 'Sürme') kotiledonlarından adventif sürgün organogenezisi ve bitki rejenerasyonu incelenmiştir. Diploid Diyarbakır karpuzunun kotiledonlarından 3 haftalık kültür sonucunda adventif sürgünler oluşturulmuştur. Sürgün organogenesisi üzerine iki tip sitokinin, benzil aminopürin (BA) ve kinetinin farklı konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç, 0.5 mg/l BA içerenbesi ortamından elde edilirken bu oran aynı zamanda kinetinin en iyi sonuç veren konsantrasyonundan yaklaşık %50 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sürgünlerin in vitro ortamda köklenmesi, NAA ile desteklenen MS besi ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. Rejenere edilen bitkilerin %50 'den fazlası başarılı bir şekilde toprağa ekilmiştir. Sonuç olarak, yüksek kaliteli diploid Diyarbakır karpuzunun in vitro yöntemle çoğaltılabileceği ve geliştirilen bu yöntemin, karpuz çeşitlerinin ıslahında kullanılabileceği gösterilmiştir (Pirinç vd., 2003).

İn vitro koşullarda korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.)'nın hızlı çoğaltımı için bir yöntem geliştirilmiştir. Büyüme ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı optimize edildikten sonra, farklı konsantrasyonlardaki 6- benzylaniopürine (BAP), IBA ve NAA ilave edilen MS ortamında, tek bir embriyodan, 8 hafta içerisinde çok yüksek oranda sürgün çoğaltımı elde edilmiştir. En yüksek sürgün çoğaltımı, 2 mg/L BAP ile IBA'nın 0.05 ve 0.1 mg/L' lik ortamlarından ve 2 mg/L BAP ile NAA'nın 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/L 'lik ortamlarından veya 8 mg/L BAP ile 0.05 mg/L NAA ortamından elde edilmiştir. En yüksek sürgün boyu yalnızca 2 mg/L BAP'nın bulunduğu ortamda gözlenmiştir. Elde edilen sürgünlerin 1 mg/L IBA içeren MS ortamında 4 hafta içerisinde %60 oranında köklendirilerek, normal bitkiler haline geldiği belirtilmiştir (Sancak, 1999).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)' nin kotiledonlarından rejenerasyonda, etilen'in rolü araştırılmıştır. Yüksek frekansta sürgün organogenesisini içeren rejenerasyon, ayçiçeğinin 30 genotipinde olgun kotiledon dokularından tanımlanmıştır. Kotiledon eksplantları için 3 gün sıvı MS besiyerinde inkübasyona bırakılmış sonra, aynı besiyerinde alt kültüre alınmıştır. 4 hafta sonra sürgünler kök oluşumu için besiyerine aktarılmıştır. Daha sonra köklenen bitkilerin dış ortama başarıyla

aktarılmasıyla fertil bitki oluşumunun görüldüğü ve sürgün gelişiminin etilenle arttığı belirtilmiştir (Chraibi vd., 1992).

Olgun ayçiçeği kotiledonlarından yüksek oranda bitki rejenerasyonu gerçekleştirmenin amaçlandığı çalışmada, ayçiçeğinde doku kültürünün verimlilik, kolay üretim ve güvenilirlik gibi karakterlere bağlı olduğu görülmüştür. Bitki rejenerasyonunda en çok kullanılan yöntemin, olgunlaşmamış embriyolarla çoğaltım yöntemi olduğu belirtilmiştir. Kotiledonlar kullanılarak en etkili rejenerasyon yöntemi uygulanmıştır. Eksplant tipine, yaşına ve genotipine göre besiyerine hormon ve nitrojen eklenmiştir. Rejenere olan bitkiler dış ortama aktarılmış ve tohumların herbirinden bitki oluştuğu gözlenmiştir. Eksplantın izole olmasından toprağa aktarımına kadar 4-6 ay süre geçtiği belirtilmiştir (Knittel vd., 1990).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) olgunlaşmamış embriyolarından fertil bitki oluşumuyla ilgili çalışmada, olgunlaşmamış embriyoların hipokotillerinden fertil bitki oluşturulmuştur. Olgunlaşmamış embriyolar, zigotik ve somatik embriyo gelişimine uygun besiyerinde kültüre alınmışlardır. Besiyerinde sürgün ve kök oluşumu gözlenmiştir. Genç bitkicikler toprağa aktarılmıştır. Bu yöntem altı farklı kültürde uygulanmıştır. Ayçiçeği olgunlaşmamış embriyoları için kullanılan bir yöntemdir (Freyssinet ve Freyssinet, 1988).

Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) kallus üretiminin ve sürgün rejenerasyonunun gerçekleştiği çalışmada, ayçiçeğinin yaprak ve kotiledon parçaları, sürgün ucu ve hipokotil segmentleri çeşitli konsantrasyonlarda oksin 2,4 –D veya sitokinin 6 – BAP içeren MS besiyerinde gelişmiştir. Eksplant tipine ve hormonal davranışına göre farklılıkların olabildiği gösterilmiştir. 6 –BAP'nin farklı eksplantlardan kallus oluşumunda etkili olduğu ve 2.4 –D' de yavaş gelişim sağlandığı belirtilmiştir. 6 –BAP tarafından birçok kallusun gelişimiyle in vitro ortamda sürgün oluşmunun sağlandığı gösterilmiştir (Greco vd., 1985).

4^0C'de saklanan aksillar tomurcuklardan sürgün çoğalmasıyla çayın (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) üretilmesinin amaçlandığı çalışmada, mikropreperasyon ve yapay tohum teknikleriyle germplazm' da etkili değişikliklerin yapılabildiği ve özellikle çay yetiştirilen ülkelerde başarıyla uygulanan muhafaza yöntemi olduğu gösterilmiştir. Çay embriyoları düşük muhafaza kapasitesine sahiptir. Nod eksplantları laboratuvar koşullarında kültürde düşük sıcaklıkta (4^0C) 15, 30, 45 ve 60 gün MS1'e, sonra

hormonsuz MS besiyerine aktarılmıştır. 4^0C' de muhafaza edilmesine rağmen tomurcuk oluşumunu etkilemediği gözlenmiştir. Düşük sıcaklıkta muhafazanın 15 günle birlikte gelişim süresini azalttığı belirtilmiştir. 4^0C'de tomurcukların 25^0C'de muhafaza edilene oranla daha kısa zamanda (15 günde) geliştiği görülmüştür. Sürgün oluşumunun ise diğer alt kültürlerde görüldüğü belirtilmiştir (Mondal vd., 2002).

Germplazm muhafazasında doku kültürü ve dağılımının etkisi araştırılmış ve doku kültürünün bitki materyalinin çoklu üretiminde, muhafazasında, saklanmasında ve dağılmasında etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Eşsiz bitki germplazm'ını muhafaza etmekle filizlenme, çoğalma ya da bitkiyi yayma açısından, zamandan, yerden ve laboratuvar ihtiyaçlarından kazanç sağlanır. İn vitro saklanan bitkiler aylarca, yıllarca muhafaza altında tutulabilir. Bitkiler 4^0C'de aylarca yeni besiyerine aktarılmadan kalabilirler. Az soğuğa toleranslı bitkiler bile oda sıcaklığında minimal düzeyde muhafaza edilmişlerdir. İn vitro saklama germplazm muhafazısında kullanılmıştır ve bitki genotipini çoğalabilme özelliklerini içermiştir. İn vitro apikal meristemin çoğalmasının, sağlıklı germplazm stokları için virüssüz bitki eldesinde önemli olduğu belirtilmiştir (Barbara, 2005).

2.6. Bitki Hakkında Genel Bilgiler (*Helianthus annuus* L. (Ayçiçeği))

Alem: Plantae
Bölüm: Magnoliophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Takım: Asterales
Familya: Asteraceae
Cins: *Helianthus*
Bilimsel Adı: *Helianthus annuus* Linnaeus

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Asteraceae familyasından sarı renkli büyük çiçekleri olan, boyu 1–2 m. civarında, sert gövdeye sahip, parçasız, üçgen biçimli, tüylü,

yeşil renkli, sert ve büyük yaprakları olan, sert ve kısa tüylü bir yıllık otsu bir bitkidir (Eken, 2004). C3 bitkileri arasında en verimli olanıdır. Ayçiçeğinin C4 bitkilerine nazaran en büyük avantajı sulandığında %100'e yakın verim artışı sağlamasıdır. Yabani ayçiçeğinin ilk yetiştiği yer olarak Kuzey Amerika bilinmektedir. Kanada'nın merkezinden Meksika'nın kuzeyine doğru yayılma gösterir (Duke, 1983). Dünyada soya ve yerfıstığından sonra üçüncü sırayı alan önemli bir yağ bitkisidir. Ayçiçeği, ülkemiz ekonomisi açısından en önemli yağlı tohumlu bitkilerden biridir. Yetiştiriciliği yapılan yağlı tohumlu bitkiler içinde, ekim alanı ve üretim miktarı bakımından birinci sırada yer almaktadır. Tohumları %40–50 oranında yağ içermekte olup, bitkisel yağ üretimimizin %65'i ayçiçeğinden elde edilmektedir. %40–45 oranında elde edilen küspesi %30–40 oranında protein içermekte olup, değerli bir yem olarak hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Yemeklik yağ dışındaki yağlar, sabun ve boya sanayide değerlendirilmekte, sapları da yakacak olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, ayçiçeği tohumu çerezlik olarak da tüketilmektedir. Oldukça sağlıklı olan ayçiçeği çekirdeği, fındık türü diğer kabuklu ürünlerle karşılaştırıldığında protein bakımından zengindir. Potasyum ve vitamin E bakımından da zengin olan ayçiçeği çekirdeği, önemli bir linoneik asit kaynağıdır (Duke, 1983).

Derin ve kazık kök sistemine sahip olması nedeniyle, kuraklığa dayanımı fazladır. Ayçiçeği, kara iklim kuşağında ve ılıman iklim yağışlı bölgelerinde de yetiştirilebilmektedir. Her türlü toprakta yetişmesine rağmen, iyi drenajlı, nötr PH /6.5-7.5)'a sahip, derin, rutubetli, iyi nem tutan humuslu, organik maddelerce zengin topraklarda iyi yetişir. Çünkü iyi çimlenebilmesi için toprakta yeterince nem bulunmalıdır. Bitki asiditesi yüksek olan topraklardan hoşlanmaz (Eken, 2004). Ayçiçeği güneşli ortamları seven bir bitkidir. Işığı sevdiği için bulutlu havalardan çok etkilenir. Çiçeklenme ve tohum bağlama dönemlerinde havanın bir ay süreyle kapalı olması tane verimini %30 düşürmektedir. Ayçiçeğinin çimlenmesi için en az toprak sıcaklığı 8–10 ^{0}C olmalıdır. Ayçiçeği soğuğa dayanıklıdır ancak ısının – 4 ^{0}C'nin altına düşmesiyle oluşan dondan oldukça fazla etkilenir. Ayçiçeğinin en önemli zararlısı orobanş parazitidir. Orobanş, köklerin geliştiği sırada kökler üzerine tutunarak beslenir. Bunun yanında diğer hastalıklar ayçiçeği mildiyösü, sap, kök ve tabla çürüklükleridir. Ayçiçeğinde orobanş zararı, topraktan fazla potasyum kaldırmaktadır. Bu nedenle aynı tarlaya üst üste ayçiçeği ekilmesi iyi değildir (Eken, 2004). Ayçiçeğinde bulunan E

vitamini gibi antioksidan maddelerin fazlalığı, vücudun kansere karşı direncini arttırmaktadır. Ayçiçeğinin çekirdekleri idrar atıcı ve göğüs yumuşatıcıdır (Duke, 1983).

2.6.1. Ayçiçeği üretiminin Dünya'daki durumu

Dünya ayçiçeği üretim miktarı 2001 ve 2003 yılları itibariyle incelendiğinde, dengeli bir seyir izleyerek arttığı görülmektedir. 2003 yılı verilerine göre Rusya dünya çapında en çok ayçiçeği üreten ülke konumundadır ve toplam dünya ayçiçeği üretiminin %16'sını bu ülke karşılamaktadır. Rusya'da 1860 yılında başlayan yağ üretim miktarı %28'den %50'lere artmıştır. Daha sonra Ukrayna, Arjantin, Amerika ve Çin dünya ayçiçeği üretiminde en çok paya sahip ülkelerdir. Bu sıralamada Türkiye 8. sırada yer almaktadır. Ayçiçeği dünyada ve Türkiye'de en önemli yağ bitkilerinden biridir (Eken, 2004).

2.6.2. Ayçiçeği üretiminin Türkiye'deki durumu

Eskiden ülkemizde tereyağı, kuyruk yağı, iç yağı ve zeytinyağı tüketimi yaygınken, daha sonraları insanlarımızın tüketim alışkanlıkları değişerek kullanılan yağın %69'unu bitkisel yağlar oluşturmuştur (Eken, 2004). Artan nüfusa paralel olarak ülkemizin bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. Ülkemiz insanının bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağını tercihi ve gerekli bitkisel yağın yarısını dışarıdan ithal etmek zorunda olmamız, son yıllarda ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır (Kaya, 2004). Kullanılan bitkisel yağların %57'sini ayçiçeği yağı oluşturmaktadır. Ayçiçeğinin ülkemizdeki en önemli tüketim şekli yağlıktır.

Ayçiçeğinin hem sıvı yağ hem de margarin sanayinde kullanılması değerini daha da arttırmaktadır. Türkiye'de yıllık kişi başı bitkisel yağ tüketimi 20 kg. civarındadır. Türkiye'deki ayçiçeği ekiliş alanlarının %73' ü Trakya- Marmara, %13' ü İç Anadolu, %10' u Karadeniz, %3' ü Ege ve %1' i Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindedir (Eken, 2004).

2.6.3. Ayçiçeği ıslahında güncel uygulamalar ve yakın gelecekte yapılacak çalışmalar

Ayçiçeğinde bugüne kadar yapılan gerek klasik ıslah, gerekse biyoteknolojik metodlar ile üstün verim ve kalite özelliklerine sahip birçok hat ve çeşitler geliştirilmiş, hastalıklara, orobanşa ve zararlılara dayanıklı, yabancı ot ilaçlarına dominant olan hibritler elde edilmiştir.

Geniş bir genetik çeşitliliğe sahip ayçiçeği türlerinden, embriyo ve doku kültürü vb. metodlar yardımıyla istenilen karakterlerdeki bu geniş varyasyonun kültür yapılan türlere aktarılması sağlanmakta ve bu yöndeki çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Halen in vitro kültürüyle hastalıklara ve kurağa dayanıklılık genlerin tespiti; *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak diğer türlerden ayçiçeğine yabancı genlerin aktarılması, anter ve mikrospor kültürüyle double haploidlerin elde edilmesi gibi yöntemler kullanılarak ayçiçeğinde önemli özelliklerin genetik haritalarının çıkarılması, ayçiçeği biyoteknolojisinde elde edilmiş başarılardır.

Gelecekteki çalışmalar öncelikle, daha çok ayçiçeğinde önemli problem olan hastalık ve zararlılara dayanıklılığın belirlenmesine yönelik gen haritalarının çıkarılması ve geniş alanlarda ekilen ayçiçeğinde oluşan kuraklığa dayanıklı genlerin belirlenmesine yönelik olacaktır (Kaya, 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyallerin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tohumları, Edirne Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışma, kontrol ve deney grubu olacak şekilde planlanmıştır. Kontrol grubu bitkileri olarak yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar kum kaplarına her kaba 10 tohum gelecek şekilde ekilmiştir. Bunlar Biyoloji Bölümü Doku Kültürü Labotaratuvarı'nda 25–26^{0}C'de çimlenmeye bırakılmıştır. Günlük olarak kontrolleri yapılan bitkiler 8–10 yapraklı olduklarında gövdelerinden kesitler alınmıştır. Bu kesitler safranin boyası kullanılarak 50^{0}C'de hazırlanmış gliserin-jelatin (%50 gliserin- %50 jelatin) ortamı ile kapatılıp daimi preperat haline getirilmiştir. Kesitler ışık mikroskobu ile incelenip Olympus CH 2 fotomikroskobu ile fotoğrafları çekilerek anatomik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca kontrol grubu bitkilerinden kök uçları alınarak aseto-orsein boyası ile ezme preperasyon yöntemi kullanılarak mitoz preperatları hazırlanmıştır. Bu preperatlar daimi hale getirilip hem ışık mikroskobu ile hem de fotomikroskop ile elde edilen görüntüleri üzerinde mitotik aktiviteyi belirlemek amacıyla mitoz bölünme aşamasındaki hücreleri saptanmıştır.

Deney grubu bitkilerini elde etmek için tohumlardan çıkartılan olgun embriyolar kullanılmıştır. Bu amaçla tohumlara yüzey sterilizasyonu (2 dakika %70 alkolde, 2 dakika steril destile suda, 2 dakika %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 2 dakika süreyle steril destile suda bekletilmiştir) işlemi uygulanmıştır. Daha sonra steril kabin içersinde embriyolar çıkartılarak tekrar yüzey sterilizasyon işlemi (1 dakika süre ile %70 alkolde, 1 dakika süre ile steril destile suda, 1 dakika süre ile % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 1'er dakika süre ile steril destile suda bekletilmiştir) yapılmıştır. Bu embriyolar, içerisinde 0,5 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) Basal Salt Micronutrient Solution (Sigma) besiyeri içeren petri kaplarına herbir kaba 10 embriyo gelecek şekilde ekimi

yapılarak önce karanlık ortamda, daha sonra 25–26^{0}C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta iklim dolabında gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 3.1.1.).



Şekil 3.1.1. Petri kabına ekimi yapılmış embriyolar

Bu embriyolar her gün kontrol edilerek gelişimleri izlenmiş ve yaklaşık olarak 5–7 gün sonunda gelişmeye başladıkları gözlenmiştir. Gelişmeye başlayan embriyolar, içerisinde yeni besiyeri bulunan büyük kültür kaplarına alınmıştır. Daha sonra 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodu olacak şekilde 25–27^{0}C'de iklim dolabında gelişmelerini sürdürmeleri sağlanmıştır. 10 gün sonunda kültürdeki embriyolarda, kök gelişiminin, 13–15 gün sonra ise gövde ve yaprak oluşumlarının meydana geldiği gözlenmiştir. Daha sonra bu fideler steril şartlarda yeni besiyeri içeren büyük kültür kaplarına alınmıştır. Bu kaplarda büyümeye bırakılmıştır. Bitkiler 4–6 yapraklı olduklarında tekrar yeni besiyeri içeren kaplara aktarılmıştır. Bunlardan 10 tanesi +4^{0}C'de 30 gün süreyle bekletilmek üzere ayrılmıştır. Diğerleri de iklim dolabında 25-27^{0}C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta gelişmeye bırakılmıştır. 30 günlük süre sonunda soğuk ortamda bekletilen ve iklim dolabında 25-27^{0}C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyot ortamında bekletilen bitkilerdeki anatomik değişimleri incelemek

için gövde kesitleri alınmıştır. Bu kesitler safranin boyasıyla boyanarak gliserin-jelatin yöntemiyle kapatılmış ve daimi hale getirilmiştir. Işık mikroskobu ile incelemeler yapılarak fotomikroskop ile fotoğrafları çekilmiştir. Soğukta muhafaza edilen bitkiler ile iklim dolabında 25-27^{0}C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyot ortamında yetiştirilen bitkiler arasındaki mitotik aktiviteyi karşılaştırmak için her iki gruptan alınan kök uçlarına aseto-orsein boyası kullanılarak ezme preperasyon yöntemi uygulanmış ve preperatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Bu preperatlar üzerinde ışık mikroskobu incelemeleri yapılarak mitoz bölünme halindeki hücreler sayılmıştır. Ayrıca bu preperatlardan çekilmiş fotoğraflar üzerinde de aynı değerlendirmeler yapılmıştır.

4.BULGULAR

Çalışmada kontrol grubuna ait bitkilerin gövde anatomileri ve mitotik aktiviteteleri, deney grubu bitkileri ile karşılaştırılma amacıyla incelenmiştir. Deney grubu olarak planlanan bitkiler embriyonik kültür yöntemiyle elde edilmiş olup bunların bir kısmı soğukta muhafaza yöntemiyle bekletildikten sonra gövde anatomileri ve mitotik aktivitleri incelenmiştir. Bir kısmı ise doğrudan kültürde yetiştirildikten sonra alınarak aynı incelemeler yapılmıştır.

4.1. Morfolojik Bulgular

Kontrol grubu bitkilerini elde etmek için kumlu ortamda yapılan çimlendirme denemelerinde ortalama 7 günlük süre sonunda %83 oranında çimlenme gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1.1.). Bu bitkiler normal gelişme göstermiş olup 30 günlük süre sonunda kök, gövde ve yaprak gelişimi göstermiştir (Şekil 4.1.1.).

Çizelge 4.1.1. Kum ortamına ekilen tohumların çimlenme sayıları

Deneme No	Ekilen tohum sayısı	Çimlenen tohum sayısı
1	10	7
2	10	10
3	10	7
4	10	8
5	10	9
6	10	10
7	10	8
8	10	8
9	10	7
10	10	9
Toplam:10	Toplam:100	Toplam:83

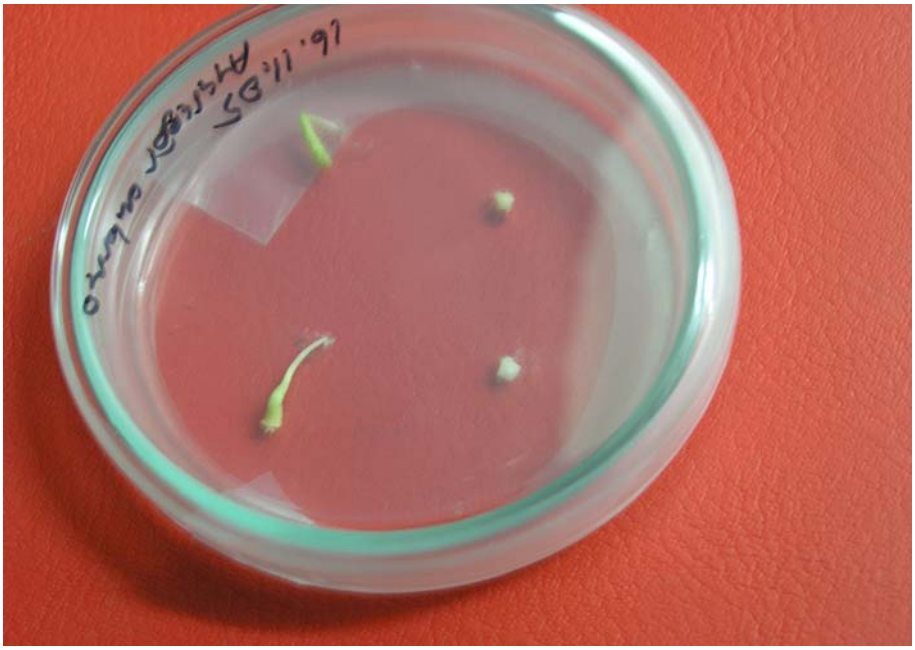


Şekil 4.1.1. Kum ortamında çimlenmiş fideler

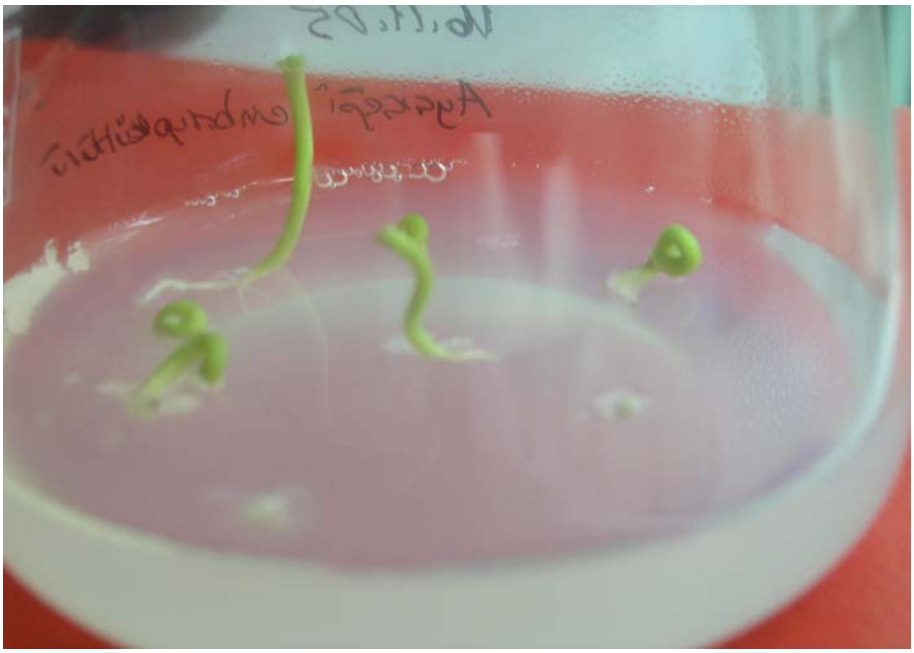
Deney grubu embriyo kültürü bitkilerini elde etmek için petri kaplarına ekilmiş olan embriyolar, 25–27^{0}C'de karanlık ortam şartlarında iklim dolabında bekletildiklerinde 5–7 günlük periyot sonunda %85 oranında gelişim göstermişlerdir (Çizelge 4.1.2.). Daha sonra 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda ve 25–27 ^{0}C'lik sıcaklıkta gelişmeye bırakılmışlardır. Bu süre sonunda gelişme gösteren embriyolar yeni besiyeri konulmuş petri kaplarına seyreltilerek aktarılmıştır (Şekil 4.1.2.). Bu fidelerde yaklaşık 10 gün sonra kök, 13–15 gün sonra gövde ve yaprak oluşumu başlamıştır. Gelişen bu fideler yeni besiyeri bulunan büyük kültür kaplarına aktarılarak iklim dolabında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda 30 gün süreyle ve 25–27 ^{0}C'lik sıcaklıkta gelişmeye bırakılmıştır. Bu fidelerde normal yaprakların oluştuğu ve besiyeri içersinde çok sayıda kök oluşumu gözlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.3, 4.1.4., 4.1.5., 4.1.6.).

Çizelge 4.1.2. Petri kabında gelişen embriyo sayıları

Deneme No	Embriyo sayısı	Gelişen embriyo sayısı
1	10	8
2	10	7
3	10	10
4	10	9
5	10	8
6	10	8
7	10	10
8	10	7
9	10	9
10	10	9
Toplam:10	Toplam:100	Toplam:85



Şekil 4.1.2. Seyreltilerek aktarılan embriyoların 5 günlük sürede gelişimi



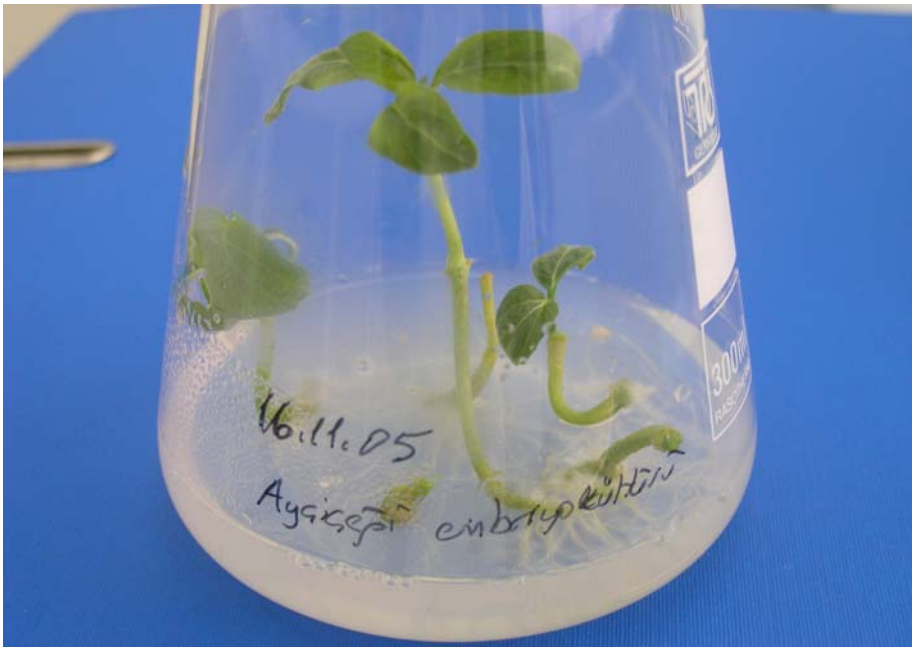
Şekil 4.1.3. Büyük kültür kaplarında gelişme gösteren fideler



Şekil 4.1.4. Kültür ortamında 8 günlük periyotta kök oluşumu



Şekil 4.1.5. Kültür kaplarında gövde ve yaprak gelişimi



Şekil 4.1.6. 30 günlük sürede meydana gelen gelişme

Embriyo kültüründe yetiştirilen bitkiler 4–6 yapraklı olunca alınan 10 fide büyük kültür kaplarında yeni besiyerine aktarılarak $+4^0$C'lik ortamda 30 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda bitkilerin gözlenebilir bir büyüme göstermedikleri, ancak mevcut morfolojik yapılarını korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.1.7., 4.1.8., 4.1.9.). Bitkilerin kök ve gövdelerinin normal görünümlerini korudukları, yapraklarının şekil ve renk olarak sağlıklı oldukları görülmüştür.



Şekil 4.1.7. +4^{0}C'lik düşük ısıda 30 gün süreyle bekletilen bitkiler



Şekil 4.1.8. +4^{0}C'lik düşük ısıda bekletilen bitkiler

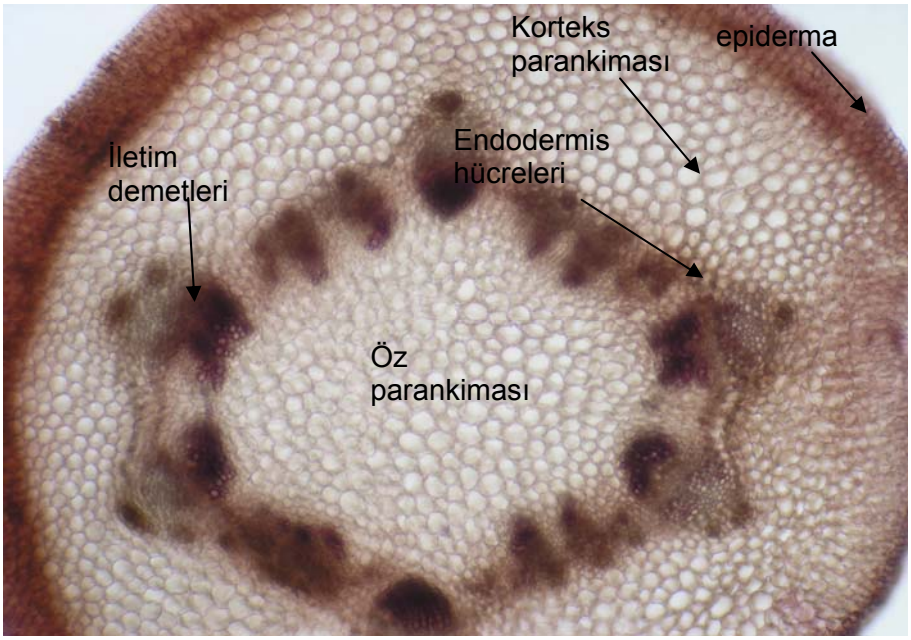


Şekil 4.1.9. +4^{0}C'lik düşük ısıda 30 gün süreyle bekletilen bitkiler

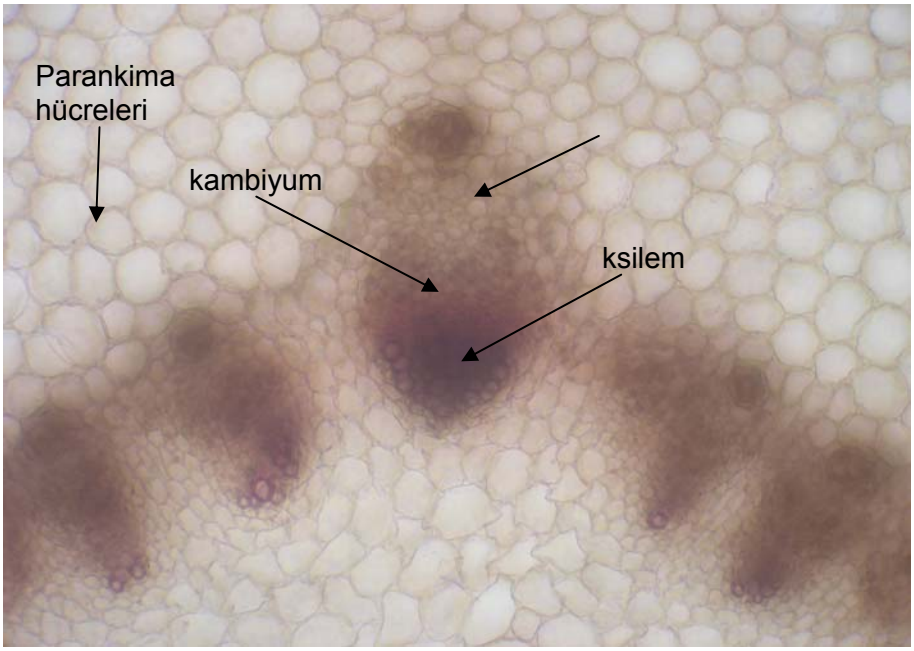
4.2. Anatomik Bulgular

Gelişen kontrol grubu bitkileri 8–10 yapraklı aşamaya geldikten sonra alınan gövde enine kesitlerinde yapılan incelemelerde gövdenin en dışında tek sıralı eşkenar hücrelerden oluşan epiderma tabakasının yer aldığı görülmüştür. Epidermanın altında korteks parankimasının bulunduğu ve bu tabakanın epiderma tabakasıyla benzerlik gösterdiği ve renk bakımından da epiderma ile aynı renkte koyu kahverengi olduğu görülmüştür. Korteks parankimasının 9–10 sıralı parankima hücrelerinden oluştuğu ve parankima hücrelerinin aralarında küçük hücre arası boşlukların bulunduğu gözlenmiştir. Parankima dokusunun içerisinde dairesel bir dizilim gösteren iletim demetlerinin yer aldığı saptanmıştır. Bu iletim demetleri ile parankima dokusunun arasında belirgin bir endoderma tabakasının olduğu görülmüştür. İletim demetlerinin dikotil bitkilerde olduğu gibi floem ve ksilemden oluştuğu ve kambiyum tabakası içerdiği gözlenmiştir. İletim demetlerinin ksilem bölgesinde sklerankimatik hücre

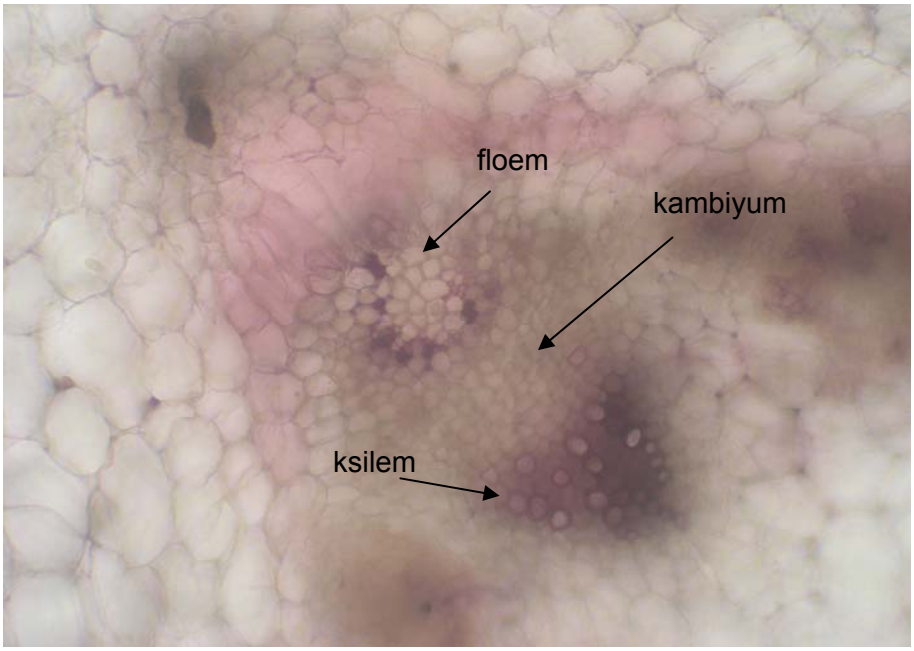
gruplarının yer aldığı fakat diğer bölgelerde sklerankima hücrelerinin bulunmadığı gözlenmiştir. Dairesel dizilimdeki iletim demetleri arasında parankima hücrelerinin bulunduğu ve öz kollarını oluşturduğu belirlenmiştir. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik dokunun yer aldığı görülmüştür. Merkezi bölgeye doğru gidildikçe parankima hücrelerinin büyüdükleri gözlenmiştir (Şekil 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3.).



Şekil 4.2.1. Kontrol grubu gövde enine kesit (X40)

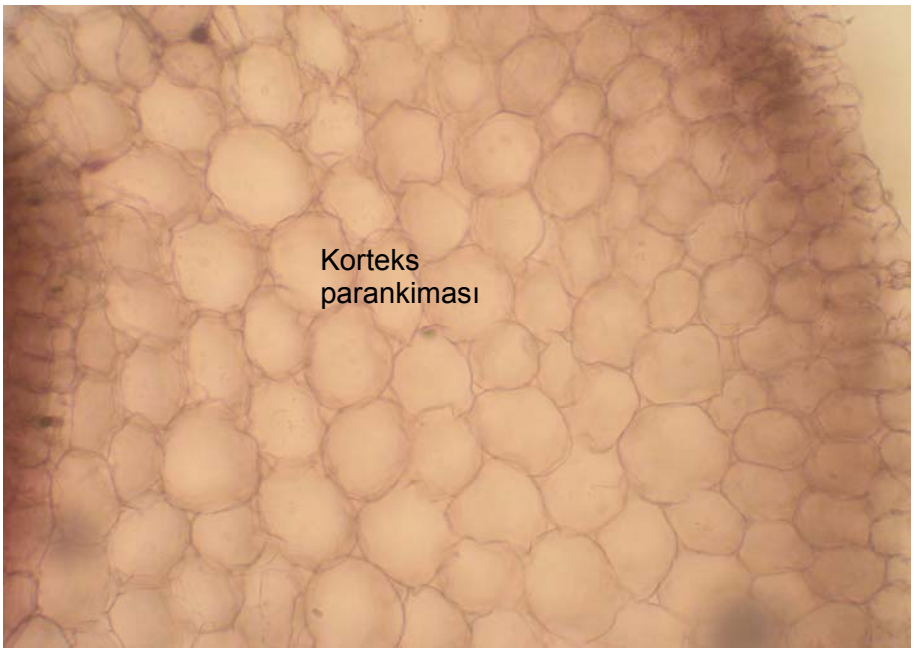


Şekil 4.2.2. Kontrol grubu gövde enine kesit (X100)

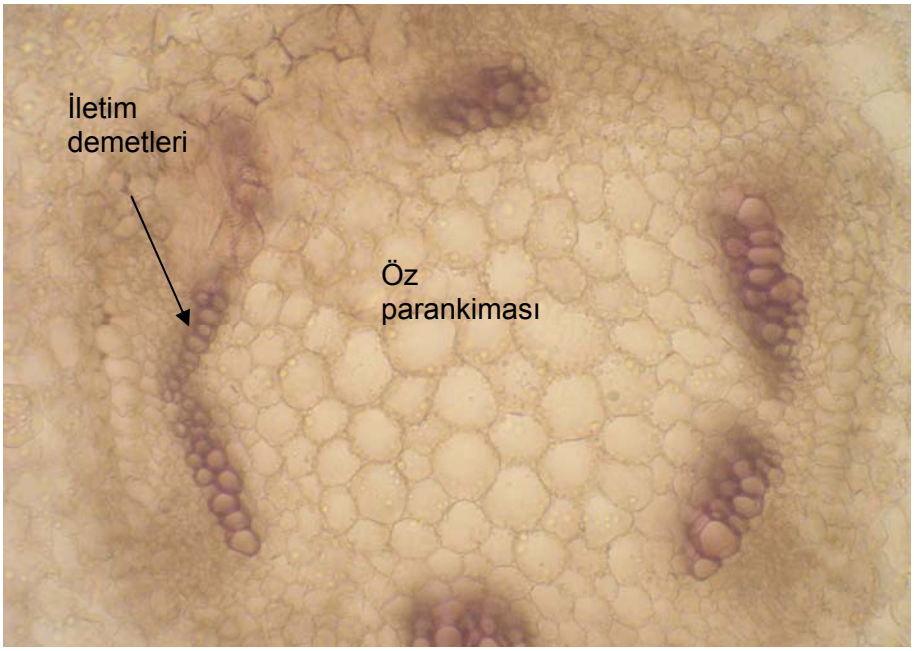


Şekil 4.2.3. Kontrol grubu gövde enine kesit (X100)

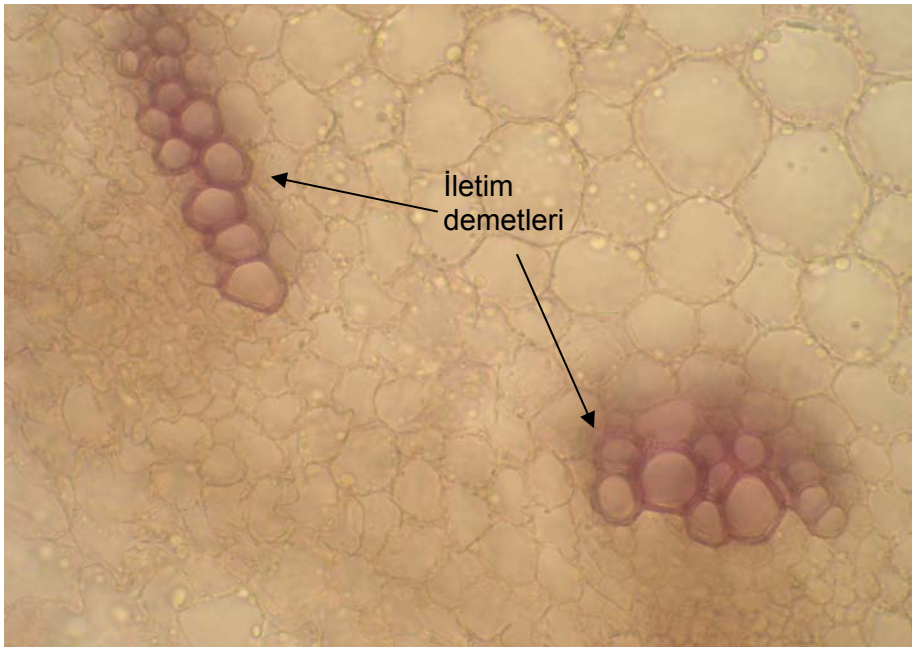
Kültürde gelişmiş olan deney grubu bitkilerinden alınan gövde kesitleri incelendiğinde gövdenin dışında değişken şekilli epiderma hücrelerinin bulunduğu görülmüştür. Korteks parankimasının 13–15 sıralı parankima hücrelerinden oluştuğu ve hücre arası boşlukların bulunmadığı saptanmıştır. Endoderma tabakasının fazla belirgin olmadığı görülmüştür. İletim demetleri fazla gelişme göstermemiş olmakla birlikte gövdede dairesel bir görünüm oluşturacak şekilde yer almıştır. İletim demetlerinde floem dokusu hücrelerinin belirgin olmamakla birlikte ksilem dokusu hücrelerinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Aralarındaki kambiyum tabakasının da belirgin olmadığı görülmüştür. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik doku yer almıştır. İletim demetlerine yakın olan parankima hücrelerinin öz kollarını oluşturduğu, merkezi bölgeye doğru gidildikçe parankima hücrelerinin büyüklüklerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.2.4., 4.2.5., 4.2.6.).



Şekil 4.2.4. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X100)

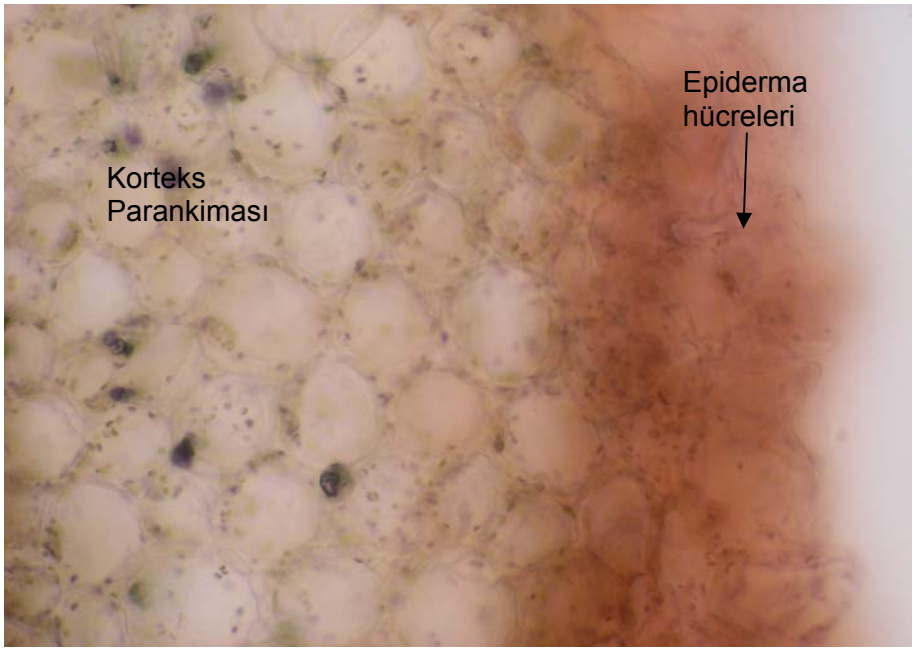


Şekil 4.2.5. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X100)

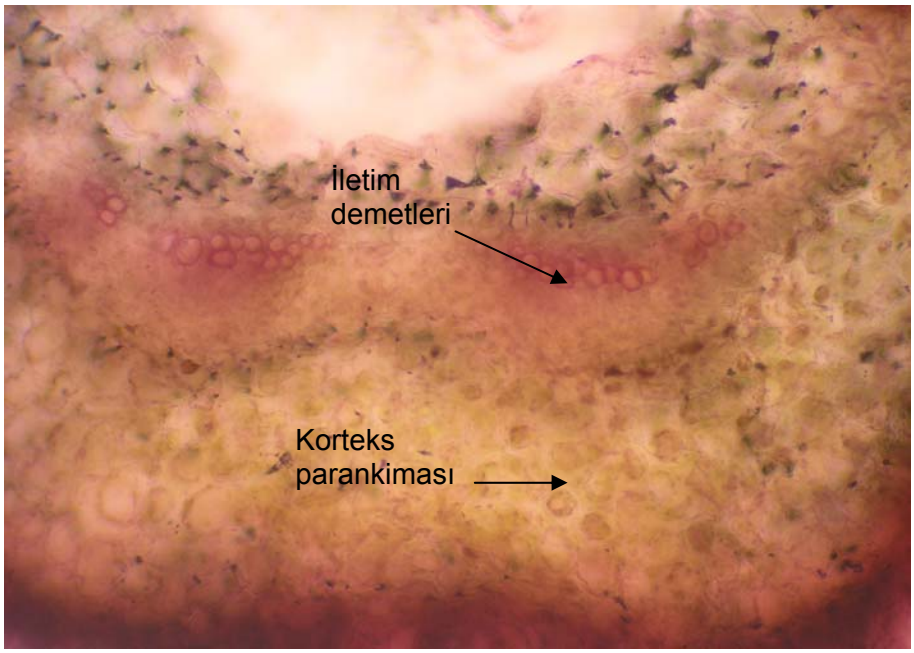


Şekil 4.2.6. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X200)

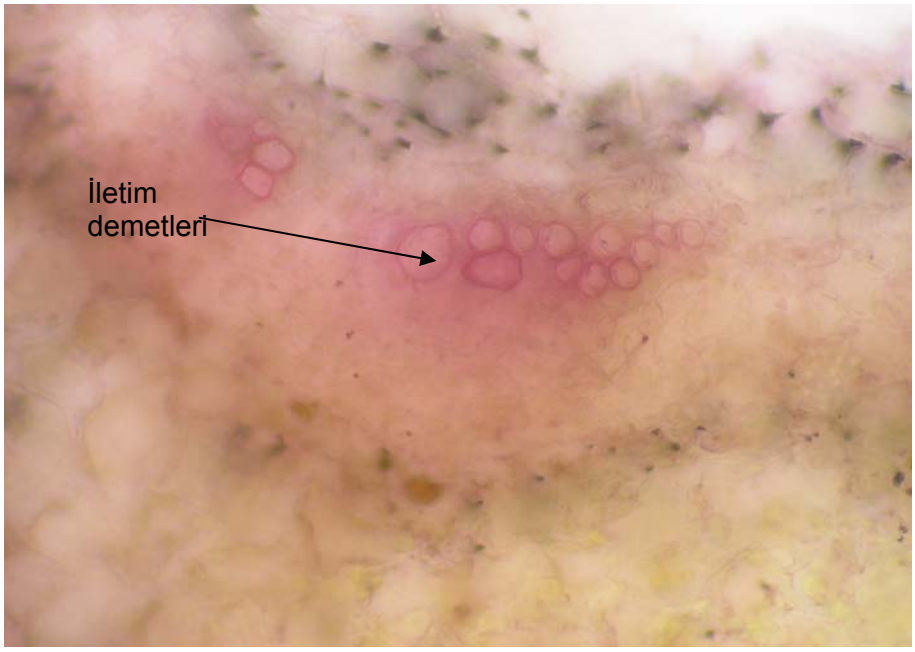
Embriyo kültüründe gelişen bitkilerden $+4^0$ C'lik ortama alınan ve 30 gün süreyle bekletilen bitkilerin gövde anatomik kesitlerinde gövdenin dışında şekilleri deforme olmuş epiderma hücrelerinin yer aldığı görülmüştür. Epiderma hücrelerine benzer şekil ve görünümde korteks parankimasının bulunduğu saptanmıştır. Korteks parankimasında yer alan parankima hücrelerinin çeper yapılarının bozulduğu, içeriklerinin koyu renkli kümeler halinde bu doku içersinde yer aldığı, bazı bölgelerde ise normal yapı ve şekillerini koruduğu görülmüştür. Parankima dokusunun bittiği yerde iletim demetlerini kuşatan belirgin bir endoderma tabakasının yer aldığı ve iletim demetlerinin fazla gelişme göstermemiş olmakla birlikte gövdede dairesel bir görünüm oluşturacak şekilde sıralandığı görülmüştür. İletim demetlerinde floem dokusu hücrelerinin belirgin olmamakla birlikte ksilem dokusu hücrelerinin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Aralarındaki kambiyum tabakasının da belirgin olmadığı görülmüştür. İletim demetlerininin arasında öz kollarının bulunduğu gözlenmiştir. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik doku hücrelerinin büyük ölçüde deforme olduğu ve iletim demetlerine yakın bölgelerde kalıntılarının bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.2.7., 4.2.8., 4.2.9.).



Şekil 4.2.7. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X100)



Şekil 4.2.8. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X100)



Şekil 4.2.9. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X200)

4.3. Karyolojik Bulgular

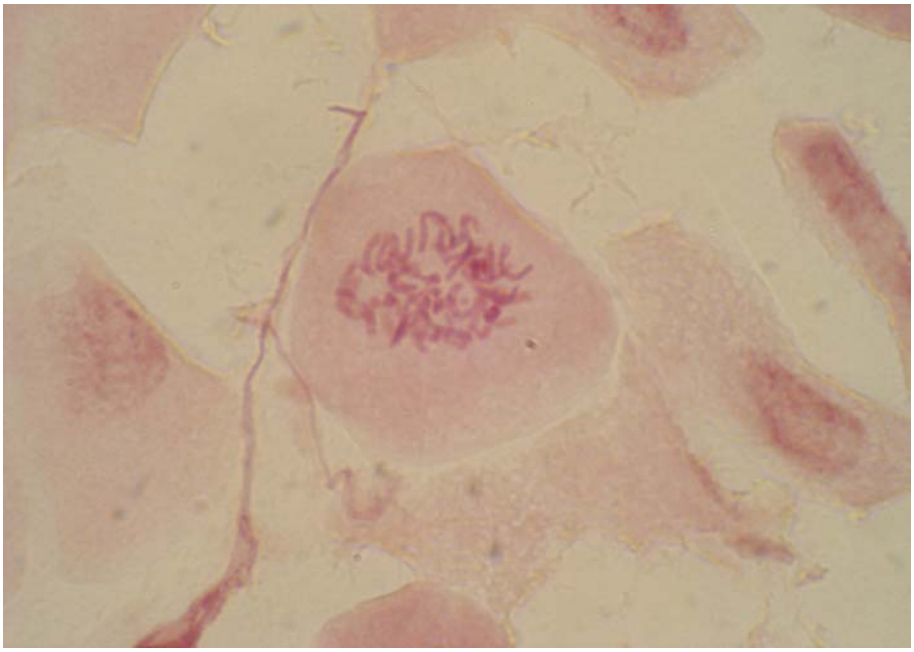
Kontrol grubu olarak yetiştirilmiş bitkiler kök, gövde ve yaprak oluşumlarını sağlıklı bir şekilde tamamlamışlardır. Bu bitkilerdeki mitoz bölünme aktivitesini incelemek için hazırlanan preperatlar ışık mikroskobu ile incelenmiş ve çekilen fotoğraflarda yapılan incelemelerde, kök ucundaki hücrelerin eşkenar şekilli oldukları interfaz aşamasındakilerin büyük nukleuslu, mitoz bölünme aşamasındakilerin ise değişik evrelerde oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.3.1., 4.3.2., 4.3.3., 4.3.4., 4.3.5.). İncelenen 10 preperatta değerlendirilen 892 hücreden 205 hücrenin mitoz bölünmenin çeşitli evrelerinde olduğu kalan 687 hücrenin ise bölünme aşamasında olmadığı görülmüştür. Mitotik indeks % 22.98 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3.1.). Bu grup bitkilerin kromozom sayılarının 2n=34 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3.1. Kontrol grubu kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme sayıları

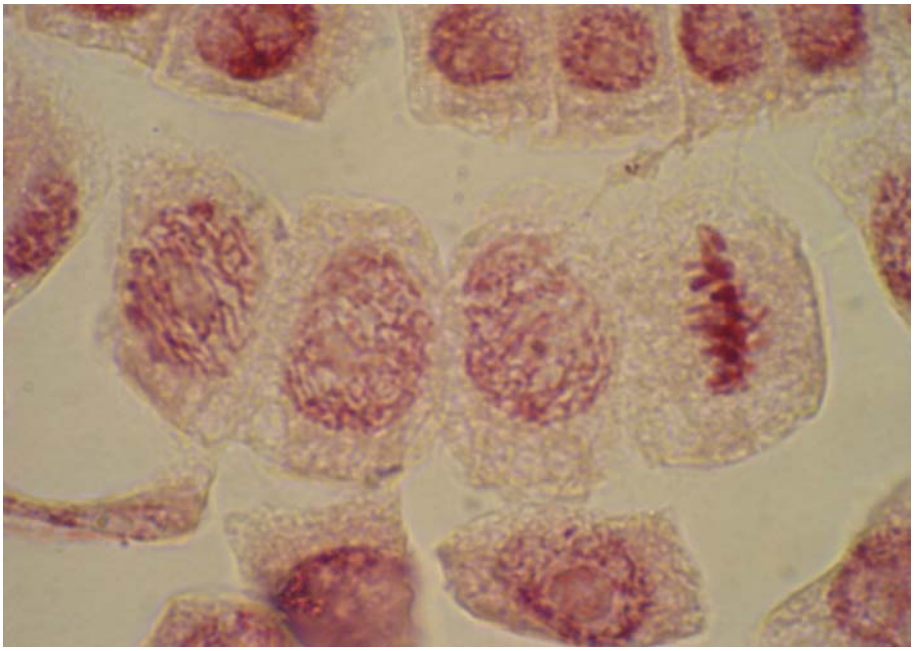
Preperat Numarası	Toplam Hücre Sayısı	Mitoz Bölünme Geçiren Hücre Sayısı
1	92	23
2	74	16
3	104	27
4	110	25
5	83	20
6	67	12
7	88	16
8	100	25
9	84	21
10	90	20
Toplam:10	Toplam: 892	Toplam: 205
Mitotik indeks: 22,98		



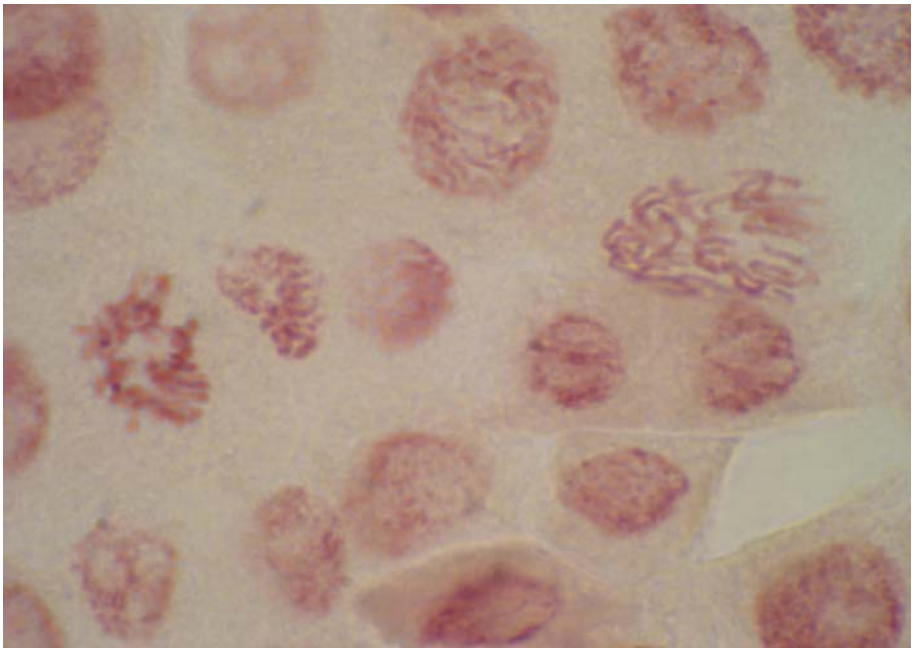
Şekil 4.3.1. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400)



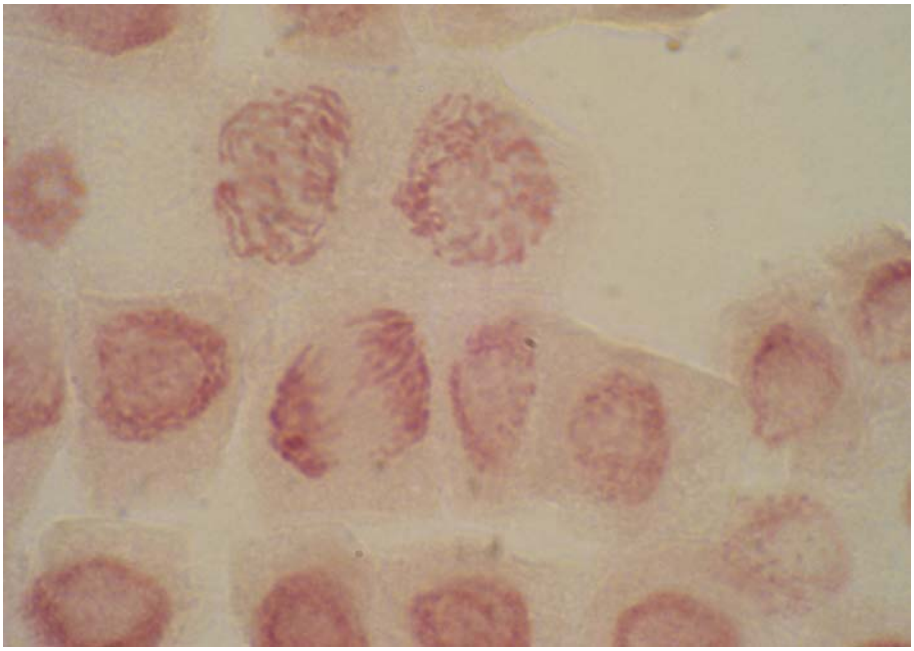
Şekil 4.3.2. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.3. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.4. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.5. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)

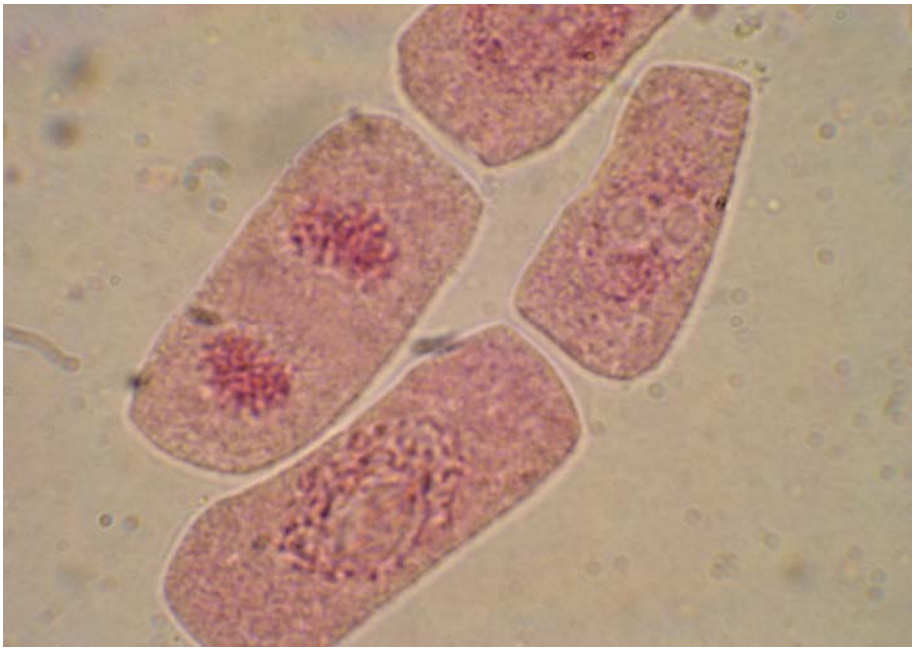
Deney grubunun normal kültür ortamında yetiştirilmiş bitkilerinden hazırlanan kök ucu preperatları incelendiğinde hücrelerinin genelde dikdörtgen şekilli oldukları nukleuslarının büyük ve tanecikli yapıya sahip oldukları ve hücrelerin birçoğunun mitoz bölünmenin çeşitli aşamalarında oldukları görülmüştür (Şekil 4.3.6., 4.3.7., 4.3.8., 4.3.9., 4.3.10.). İncelenen 10 preperatta değerlendirilen 854 hücreden 513 hücrenin mitoz bölünmenin çeşitli evrelerinde olduğu, kalan 341 hücrenin ise bölünme aşamasında olmadığı görülmüştür. Mitotik indeks % 60.00 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3.2.). Bu grup bitkilerin kromozom sayıları da 2n=34 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3.2. Deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde mitoz bölünme sayıları

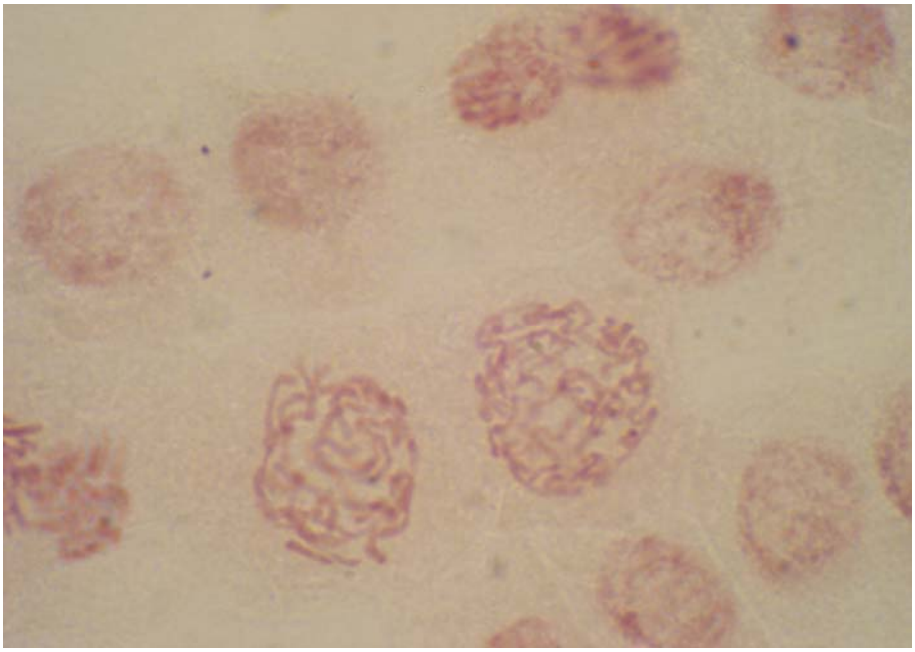
Preperat Sayısı	Toplam Hücre Sayısı	Mitoz Bölünme Geçiren Hücre Sayısı
1	90	63
2	75	40
3	88	54
4	103	60
5	64	39
6	81	45
7	97	56
8	101	61
9	70	43
10	85	52
Toplam:10	Toplam: 854	Toplam: 513
Mitotik indeks: 60,00		



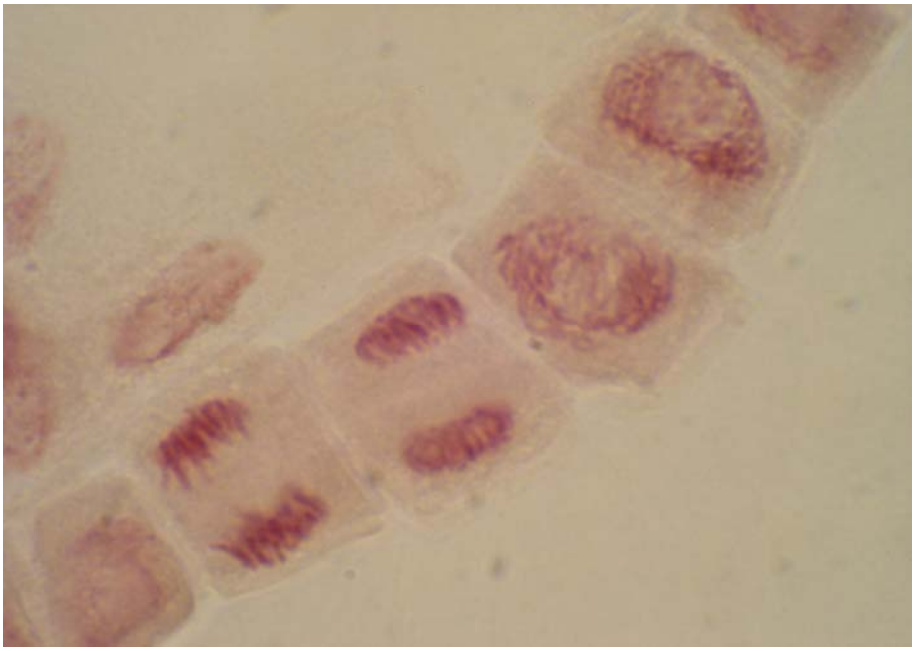
Şekil 4.3.6. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400)



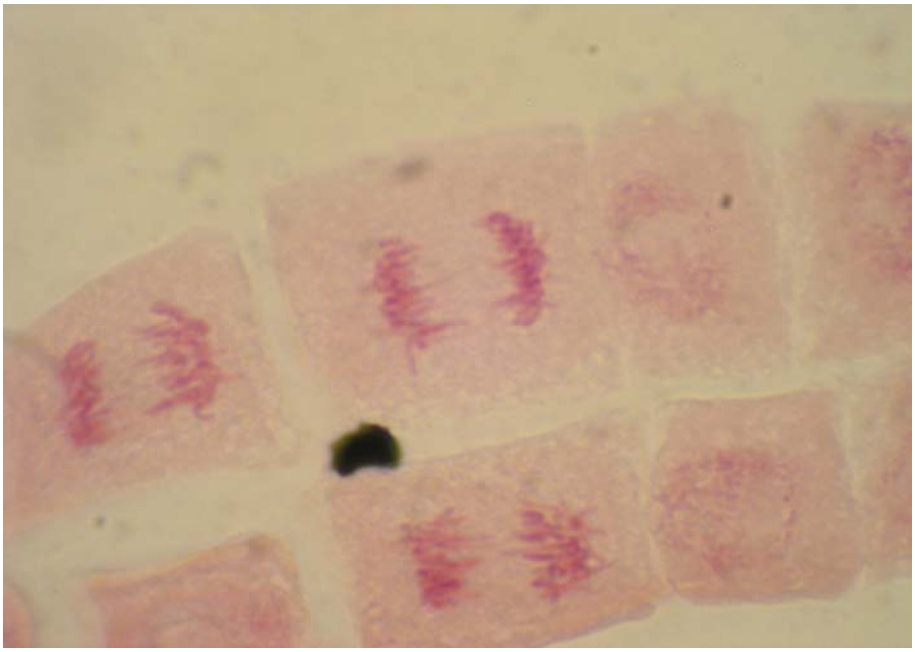
Şekil 4.3.7. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.8. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.9. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)

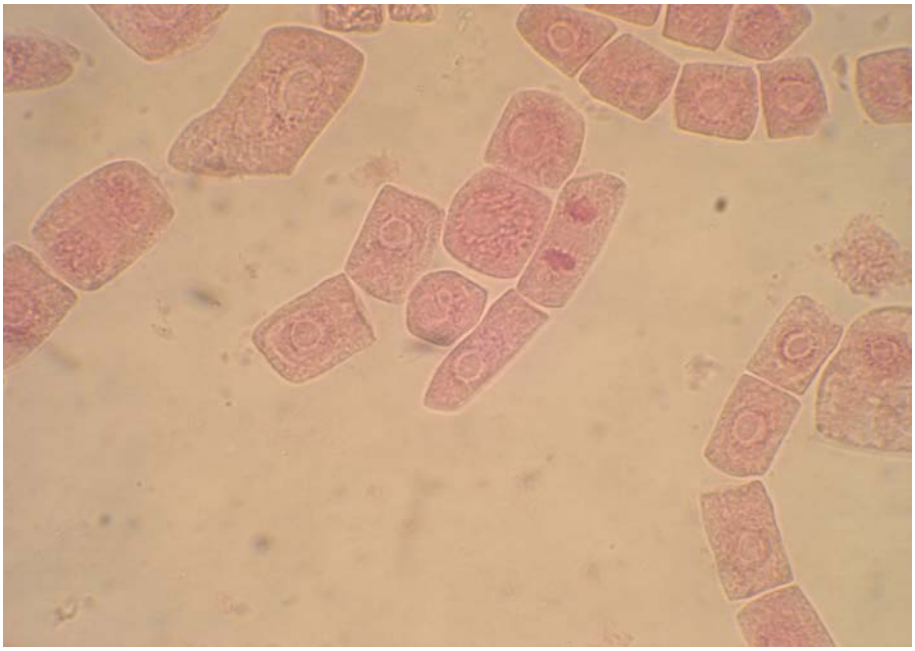


Şekil 4.3.10. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)

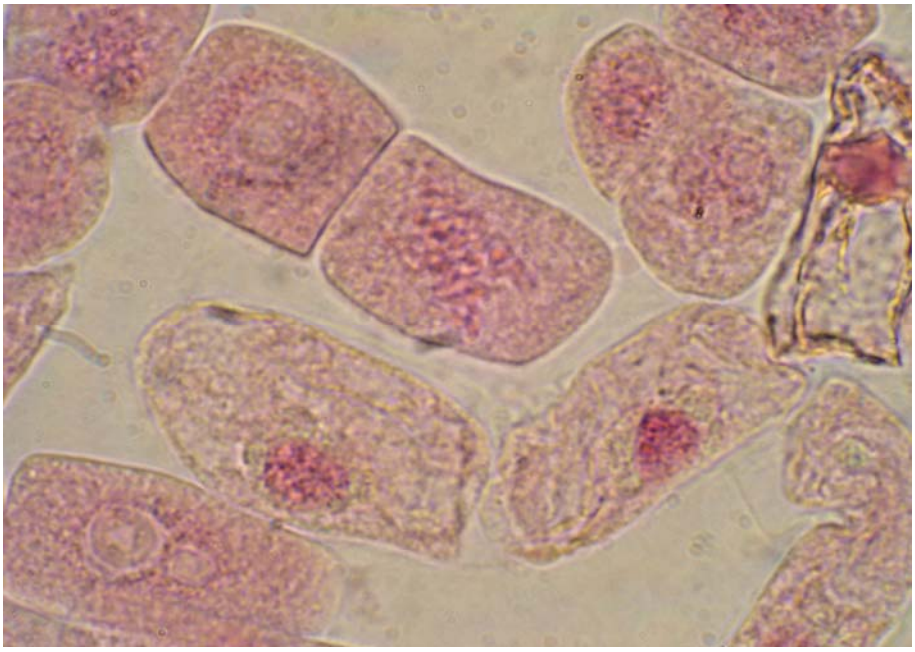
Deney grubunun soğukta muhafaza edilmiş bitkilerinden alınan kök uçlarındaki hücreler incelendiğinde, hücrelerin farklı büyüklüklerde oldukları şekillerinin değişkenlik, nukleus büyüklüklerinin farklılık gösterdiği, mitoz bölünme evresindeki hücrelerinin ise sayıca az oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.3.11., 4.3.12., 4.3.13., 4.3.14.). İncelenmiş olan 10 preperatta değerlendirilen 906 hücrede 92 hücrenin mitoz bölünmenin çeşitli evrelerinde olduğu, kalan 814 hücrenin ise bölünme aşamasında olmadığı belirlenmiştir. Mitotik indeks %10.15 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3.3.). Bu grup bitkilerin kromozom sayıları da 2n=34 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.3. Deney grubu düşük ısıda bekletilen bitkilerde mitoz bölünme sayıları

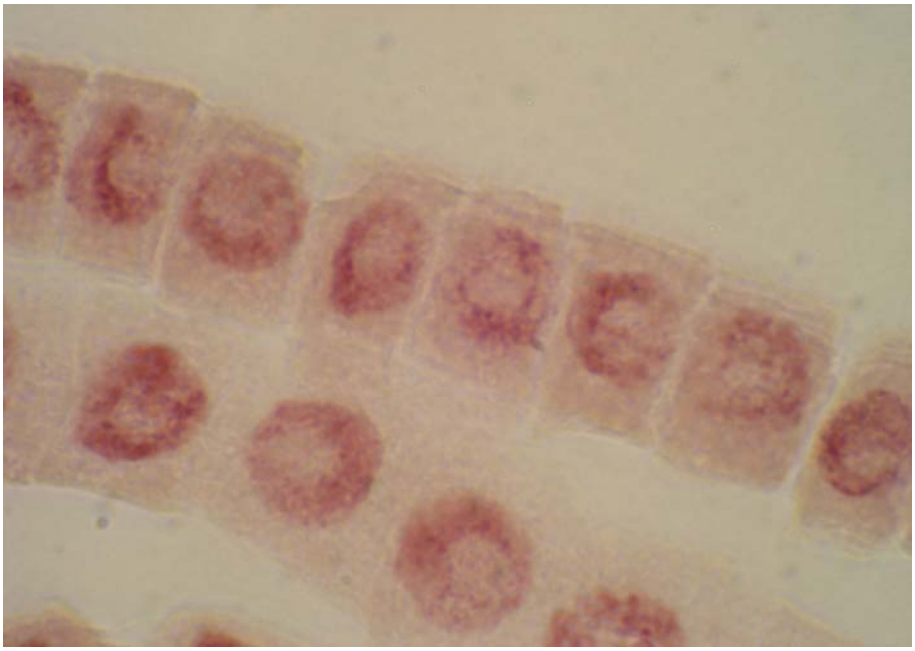
Preperat Numarası	Toplam Hücre Sayısı	Mitoz Bölünme Geçiren Hücre Sayısı
1	87	7
2	92	10
3	105	13
4	78	6
5	100	12
6	95	8
7	89	11
8	103	12
9	90	8
10	67	5
Toplam:10	Toplam: 906	Toplam: 92
Mitotik indeks: 10,15		



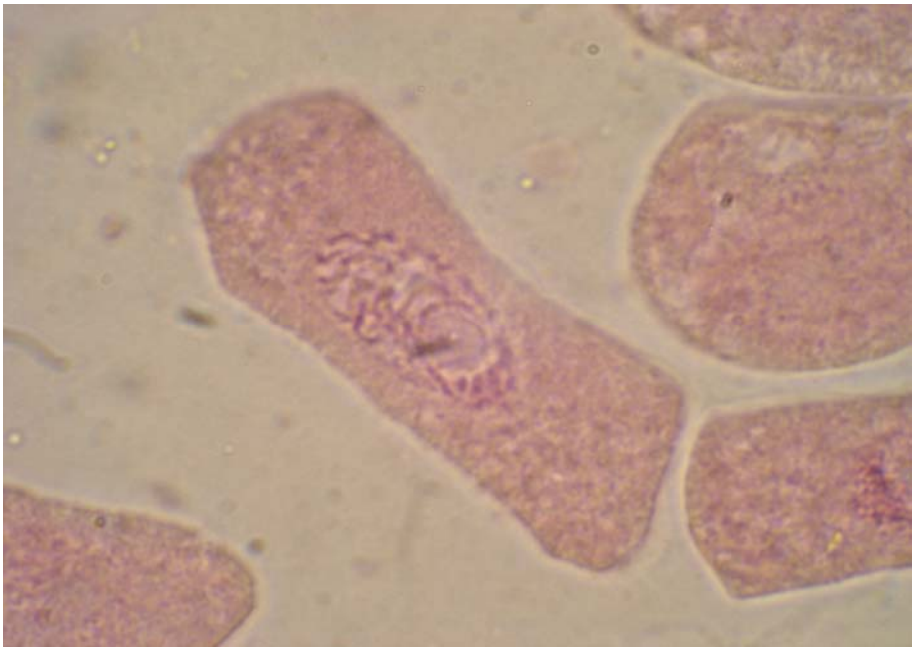
Şekil 4.3.11. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400)



Şekil 4.3.12. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.13. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)



Şekil 4.3.14. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000)

5. TARTIŞMA

İnsanlar bitkileri çok eski yıllardan beri değişen amaçlar için ya doğal ortamdan alarak ya da kendileri yetiştirerek kullanmaktadırlar. Tarih boyunca insan nufusunun artması, bu artışa bağlı olarak bitkilere olan ihtiyacın da artması birçok soruna neden olmuştur. Mevcut tarım alanlarında üretilen bitkilerin yetersiz olması ormanlık alanların tarım alanına dönüştürülmesi mevcut alanlardan daha fazla üretim sağlayabilmek için çeşitli teknikler geliştirilmesine gereksinim oluşturmuştur. Bu tekniklerin bazıları doğal dengeyi bozmaz iken bazıları ise doğal dengeye zarar vermektedir. Örneğin, çevre kirlenmesi, doğada mevcut olan türlerin yok olması, genetik yapısı değiştirilen organizmaların zararlı etkilerinin olması doğal dengeyi bozucu etkilerdir. Bitkisel üretimi arttırma amacıyla tarımsal üretime uygun olmayan ortamlarda (çöl ve kurak ortam) üretim yapılması genelde doğaya zarar vermez iken bu ortamlara uyumlu bitkilerin elde edilmesi için veya daha fazla verim sağlayan bitkileri elde etmek için ya da hastalık ve zararlılara dirençli bitkiler elde etmek için yapılan genetik çalışmalar doğal dengeyi bozucu sonuçlar oluşturabilmektedir. Günümüzde; yukarıda bahsettiğimiz amaçlara yardımcı bir yöntem olarak kullanılan bitki doku kültürü yöntemi gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle tohum yoluyla üretimi zor ve uzun olan bitkilerin bu yöntemle üretildikleri bilinmektedir. Bu yöntem sayesinde üretimi zor olan bitkiler kısa sürede ve çok sayıda üretilebilmektedirler. Bu yönteme bağlı olarak geliştirilmiş olan germ muhafazası yöntemi, üretimi zor olan bitkilerden üretilmiş bitkilerin çeşitli yöntemler ile büyümesi yavaşlatılarak muhafaza edilmesine ve daha sonra kullanılabilmelerine imkan vermektedir. Bu yöntem ayrıca, tohum elde edilmesinde ve tohum olarak muhafaza edilmesi zor olan bitkilerin neslinin devamını sürdürmede de yardımcı olabilmektedir. Kullanılan bu yöntemin in vitro şartlarda yapılmasından kaynaklanabileceğini düşündüğümüz bazı morfolojik ve anatomik değişimlerin olabileceğini planladığımız çalışmada, bu yönde bulgulara rastlanmıştır.

Morfolojik olarak çalışma sırasında, kontrol grubu ve deney grubu bitkilerinde önemli farklılıklar oluşmamıştır. Ancak, kültür ortamında yetiştirilen ve soğukta

muhafaza edilen bitkilerde iklim dolabından laboratuvar ortamına çıkarıldıklarında geçici olarak bazı bozulmalar gözlenmiştir.

Elde edilen anatomik bulgulara göre; gövdenin en dışında bulunan epiderma tabakası, kontrol grubu bitkilerinde tek sıralı olup eşkenar hücrelerden, deney grubu bitkilerinde ise değişken şekilli hücrelerden oluşmuştur, soğukta muhafazaya alınan bitkilerde ise epiderma hücrelerinin bazılarının deforme olduğu görülmüştür.

Epidermanın altında yer alan korteks parankimasının, kontrol grubunda epiderma tabakasıyla benzerlik gösterdiği ve 9-10 sıralı parankima hücrelerinden oluştuğu, hücre arası boşlukların bulunduğu görülmüştür, deney grubu kültür ortamında gelişen bitkilerde ise korteks parankimasının 13-15 sıralı parankima hücrelerinden oluşup hücre arası boşluk içermediği, soğukta muhafaza edilen deney grubu bitkilerinde ise korteks parankimasının epiderma hücrelerine benzer şekil ve görünümde olduğu ve parankima hücrelerinin çeper yapılarının bozulduğu görülmüştür.

Endoderma tabakasının, deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde fazla belirgin olmadığı, kontrol grubu ve soğukta muhafazaya bırakılan deney grubu bitkilerinde ise iletim demetleri ile parankima dokusunun arasında yer aldığı görülmüştür.

İletim demetlerinin her üç grupta da gövdede dairesel bir görünüm oluşturacak şekilde sıralandığı, kontrol grubu bitkilerinde iletim demetlerinin floem ve ksilemden oluşup kambiyum tabakası içerdiği, deney grubu bitkilerinde ise iletim demetlerinin fazla gelişme göstermediği fakat ksilem dokusu hücrelerinin floem dokusu hücrelerine göre daha belirgin olduğu, aralarındaki kambiyum tabakasının ise belirgin olmadığı görülmüştür.

Kontrol grubu ve kültürde yetişen deney grubu bitkilerinde iletim demetleri arasında öz kollarına rastlanmıştır ve gövdenin merkezi bölgesine doğru gidildikçe parankima hücrelerinin büyüklüklerinin arttığı gözlenmiştir, soğukta muhafaza edilen deney grubu bitkilerinde ise gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik doku hücrelerinin büyük ölçüde deforme olduğu görülmüştür.

Elde edilen karyolojik bulgulara göre; mitotik aktivite değerlerinin, kontrol grubunda ve soğukta muhafaza edilen deney grubunda oldukça düşük olduğu, kültür ortamında gelişen deney grubu bitkilerinde ise mitotik aktivitenin yüksek değerde olduğu görülmüştür. Mitotik indeks değerleri, kontrol grubunda %22.98, deney grubu

kültür ortamında %60.00, deney grubu soğukta muhafazada %10.15 olarak bulunmuştur. Ayrıca, tüm gruplarda kromozom sayısının 2n=34 olduğu belirlenmiştir.

Bitki doku kültürü ve embriyo kültürü ile ilgili birçok çalışma değişik amaçlarla yapılmış olmakla birlikte soğukta muhafaza yöntemiyle yapılan çalışmaların daha az olduğu görülmüştür. Bu konularda, daha önce yapılmış çalışmaların bir kısmı aşağıdadır:

Özgen vd. (1997), yonca ile ilgili yaptıkları bir çalışmada en fazla sürgünün BAP ve NAA içeren ortamlardan elde edildiğini bulmuşlardır.

Gu vd. (1990), yaptıkları bir çalışmada in vitro şartlarda arpada olgunlaşmamış embriyoya etki eden çeşitli faktörlerin ve en iyi sonucun MS besiyerinde alındığını kanıtlamışlardır. Bizim çalışmamızda da, 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanılarak çalışılmıştır.

Nagip vd. (2003), Tropikal Asya'da meristem kültürü ile yumru köklü virüssüz patates eldesi ile ilgili yaptıkları çalışmada, in vitro şartlarda virüssüz bitki eldesi için apikal meristem kullanmışlardır. IBA'nın sürgün ve kök gelişiminde ve GA_3'ün sürgün oluşturmada en etkili hormon olduğunu görmüşlerdir. Kök oluşumundan sonra bitkileri başarılı şekilde dış ortama aktarmışlardır ve herbirinin gelişimlerinin normal ve virüssüz olduğunu gözlemlemişlerdir.

Erdoğan vd. (2005), burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) bitkisinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonunu ve hızlı çoğaltımını amaçladıkları bu çalışmada, yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonunu elde etmek için 6 farklı burçak hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda TDZ içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında kültüre almışlardır. Burada eksplant başına en yüksek sürgün sayısını benzilaminopurin (BAP) ve naftalenasetik asit (NAA) içeren MS ortamından sağlamışlardır. Gelişen sürgünleri daha sonra, indol-3-bütürik asit (IBA) içeren MS ortamında köklendirmişlerdir.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002), emriyo kültürü ile ilgili yaptıkları çalışmada, arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nın olgun embriyolarının kültüründe besi ortamı bileşimi ve sterilizasyon yönteminin etkisi üzerinde durmuşlardır. Kullanılan besin ortamları içerisinde embriyodan bitkicik gelişiminin en yüksek Randolph-Cox ortamından elde edildiğini bulmuşlardır. Bunu sırasıyla MS, ½ MS ve B5 ortamlarının izlediğini gözlemlemişlerdir. Araştırılan sterilizasyon yöntemlerinden sodyum hipoklorit ile

sterilizasyonu, antibiyotik solusyonu ile muamele etme ve $HgCI_2$ ile yapılan sterilizasyondan daha etkili bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da, olgun embriyolar sodyum hipoklorid ile yüzey sterilizasyonu yapılarak kullanılmıştır ve besiyeri olarak 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) kullanılarak steril şartlarda çalışılmıştır.

Erdağ ve Yürekli (2000), Türkiye'de ekonomik öneme sahip Batı Anadolu endemiklerinden olan *Thymus sipyleus* Boiss'in (baharat) in vitro çoğaltılması üzerinde çalışmışlardır. Sterilize edilmiş bitki tohumlarını, modifiye edilmiş MS besi ortamında ve Heller besi ortamlarında çimlendirmişlerdir. En iyi çimlenmenin modifiye MS ortamında gerçekleştiğini, ancak bitkinin sonraki gelişmesi için ise Heller ortamının uygun olduğunu belirtmişlerdir. NAA ve BA ilaveli MS besi ortamına aktarılan fidelerin ortamla temas ettikleri noktalardan kallus oluşturduklarını saptamışlardır. Yine aynı ortamda rejenere olan fidelerin, 2 hafta sonra çoklu sürgün halini aldıkları ve 4. alt kültür sonunda aynı ortamda köklendiklerini gözlemişlerdir. Çalışmamızda, sterilize edilmiş embriyolar kullanılmış ve BAP ve NAA içeren MS besi ortamına ekilmiştir, besiyeri belirli sürelerle yenilenerek kallus oluşumu gözlenmeden 8 gün sonunda kök gelişimi gözlenmiştir.

Charriere ve Hahne (1998), in vitro kültürde ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) olgunlaşmamış zigotik embriyolarının kallus oluşumuna karşı embriyogenesis oluşturması ve bitki büyüme düzenleyicilerinin rolünün incelenmesiyle ilgili çalışmalarında, ayçiçeğinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarından in vitro şartlarda somatik embriyo ve sürgün oluşumunun kültür medyumunda sükroz konsantrasyonuna bağlı olduğunu bulmuşlardır. Medyum %3 sükroz içerdiğinde sadece sürgünlerin oluştuğunu, %12 sükroz içerdiğinde ise somatik embriyoların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu iki farklılığın, eklenen büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarına bağlı olmaksızın oluşan bütün morfogenetik değişikliklerin besiyeri içeriğindeki hormonlardan kaynaklandığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda, ayçiçeğinin olgunlaşmış embriyoları 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında geliştirilmiştir ve meydana gelen değişikliklerde besiyerinin önemine değinilmiştir.

Mamun vd. (2004), Bangladeş'te ki bazı önemli şekerkamışı çeşitlerinin in vitro mikroçoğaltımı üzerinde durmuşlardır. İn vitro şartlarda besiyerine eklenen büyüme

düzenleyicilerinin kallus üretiminde, sürgün farklılaşmasında ve kök oluşumunda etkili olduğunu görmüşlerdir. Kök oluşumunda en iyi sonucun modifiye MS besiyerine eklenen oksin ile gerçekleştiği görmüşlerdir. Bu çalışmada da yüzey sterilizasyonu yapılan embriyoların gelişimi in vitro kültür şartlarında MS besi ortamında gerçekleşmiş olup, MS besiyerinin kök, gövde ve yaprak oluşumunda istenilen sonucu verdiği gözlenmiştir.

Gomes vd. (2003), tehlike altındaki odunsu türlerin, *Maclura tinctoria* 'nın kallus kültüründen bitki rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarında, bazı doğal türlerden dormansi periyodu ile birlikte düşük frekanslı çimlenme özelliğinde tohumlar üretmişlerdir. 10.74 μM NAA + 4.43 μM BA içeren odunsu bitki medyumu (WPM) kullanılarak nod segmentlerinden kallus oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Yüksek frekansta sürgün oluşumunun 4.03 μM NAA + 4.43 BA içeren WPM besiyerinde görüldüğü açıklanmıştır. Kök oluşumunda ise, IBA ve aktif kömürün etkili olduğu anlaşılmıştır. Bizim çalışmamızda kök oluşumu embriyo kültüründe 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında gerçekleşmiştir.

Vargas vd. (2004), *Anthurium andreanum* 'un bitki rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarında, etkin rejenerasyon sistemi oluşturmak için tohumları 2.2 μM BA içeren medyumda çimlendirmişlerdir. İki hafta sonra, tohumların %74'ünün çimlendiğini gözlemişlerdir. Dört hafta sonra bu bitkicikten alınan küçük parçaları 4.4 μM BA ve 0.05 μM NAA içeren medyumda alt kültüre almışlardır. Herbir eksplantta sürgün oluşumunu gözlemlemişlerdir. Çimlenen tohumların dört haftalık in vitro bitkisinin ve küçük parçacıklardan oluşan bitkiciklerin kallus oluşumu gösterdiğini saptanmışlardır. Bu dokuları 8.9 μM BA ve 2.7 μM NAA içeren besiyerinde alt kültüre alımışlardır. Altı hafta sonra kallusların gelişme gösterdiğini gözlemişlerdir. Anatomik incelemelerle kallusun yapısını incelemişlerdir. Toprağa aktarılanlardan %80'inin gelişme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda etkin bitki gelişimi embriyo kültür yöntemiyle 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında gerçekleşmiş olup, 5-6 günde % 85 oranında gelişmeye başladıkları görülmüştür. Alt kültürlere alınarak bitki gelişimi sağlanmıştır. Anatomik incelemelerde gövde yapısı incelenmiştir.

Pirinç vd. (2003), diploid Diyarbakır karpuzu (*Citrullus lanatus* cv. 'Sürme') kotiledonlarından adventif sürgün organogenezisi ve bitki rejenerasyonunu incelemişlerdir. Diploid Diyarbakır karpuzunun kotiledonlarından 3 haftalık kültür sonucunda adventif sürgünlerin oluştuğunu görmüşlerdir. Sürgün organogenezisi üzerine iki tip sitokinin, benzil aminopürin (BA) ve kinetinin farklı konsantrasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından en iyi sonucu, 0.5 mg/L BA içeren besi ortamından elde ederlerken bu oranın aynı zamanda kinetinin en iyi sonuç veren konsantrasyonundan yaklaşık %50 daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen sürgünlerin in vitro ortamda köklenmesinin, NAA ile desteklenen MS besi ortamına aktarılmasıyla gerçekleştiği görülmüştür. Sonuç olarak, yüksek kaliteli diploid Diyarbakır karpuzunun in vitro yöntemle çoğaltılabileceğini ve geliştirilen bu yöntemin, karpuz çeşitlerinin ıslahında kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Nestares vd. (2002), in vitro koşullarda ayçiçeğinin bitki oluşturma yeteneği ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, ayçiçeğinin 20 faklı yerinden aldıkları kotiledonları in vitro şartlarda büyüme faktörleri içeren iki kültür ortamında bırakıp, bitki oluşturma yeteneklerini gözlemlemişlerdir. 4. haftada direkt organogenesis ile bitki oluşumunun başladığını görmüşlerdir. Tüm çeşitlerde medyumun etkisi saptamışlar ve rejenerasyon kapasitesinin kültür medyumuna bağlı olduğunu ve genotip ve diğer parametrelerin de bu değerleri etkilediğini görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda, ayçiçeği olgun embriyolarının in vitro şartlarda embriyo kültürü yöntemi kullanılarak bitki rejenerasyonu sağlanmış ve kullandığımız MS besiyerinin bitki gelişiminde etkili olduğu görülmüştür.

Greco vd. (1985), ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) kallus üretimini ve sürgün rejenerasyonunu araştırmışlardır. Ayçiçeğinin yaprak ve kotiledon parçalarının, sürgün ucu ve hipokotil segmentlerinin çeşitli konsantrasyonlarda oksin 2,4 –D veya sitokinin 6 – BAP içeren MS besiyerinde gelişebildiğini açıklamışlardır. Eksplant tipine ve hormonal davranışına göre farklılıklar olabildiğini gözlemişlerdir. 6 –BAP'nın farklı eksplantlardan kallus oluşumunda etkili olduğunu belirtmişlerdir. 2,4 –D'nin yavaş gelişim sağladığını gözlemişlerdir.

Rahman vd. (2004), *Kaempferia galanga* L. bitkisinin yaprak tabanı eksplantlarından kallus kültürü ile somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunu

gerçekleştirmiştir. Eksplant olarak kullandığı yaprak kınını parçalara ayırarak agar-jel medyumuna gömmüştür ve MS medyumunda kültüre almıştır. Kallus üretimini ve somatik embriyogenesisi farklı konsantrasyonlar ve büyüme faktörleri kullanarak gerçekleştirmiştir. Yüksek oranda kallus üretiminin MS medyumunda sağlandığını açıklamıştır. Çalışmamızda bitki rejenerasyonu, embriyonik kültür ortamında MS besiyerinde gerçekleşmiştir, kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Vookova ve Kormutak (2003), *Abies cilicica* Carr. ve hibrid *Abies cilicica×Abies nordmanniana*'nın somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu konulu çalışmalarında, somatik embriyogenesis için *Abies cilicica* Carr. ve hibriti *A. cilicica* × *A. nordmanniana*' nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarında 5μM benzilaminopürin kullanmışlar ve hazırlanan Schenk ve Hilderbrant (SH) besiyerinde somatik embriyogenesisin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Somatik embriyo olgunlaşması için MS ve SH besiyerlerine %4 maltoz ve %10 polietilen glikol–4000 kullanmışlardır. Üç hafta sonra olgunlaşan embriyoları %1 sükroz ve %1 aktif kömür içeren SH besiyerinde çimlendirmişler ve bitkicikle birlikte kotiledon, hipokotil ve radikulaların oluşmaya başladığını görmüşlerdir. Yaptığımız çalışmada, olgun ayçiçeği embriyoları uygun MS ortamında yetiştirilip bitki rejenerasyonu sağlanmıştır.5-6 günde embriyolarda gelişme, 8 günde kök oluşumu, 13-15 günde ise gövde ve yaprak gelişimi görülmüştür.

Sancak (1999), in vitro koşullarda korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin hızlı çoğaltımı için bir yöntem geliştirmiştir. Büyüme ortamındaki bitki büyümesini düzenleyicilerin oranını optimize ettikten sonra, farklı konsantrasyonlardaki 6- benzylaniopürine (BAP), IBA ve NAA ilave edilen MS ortamında, tek bir embriyodan, 8 hafta içerisinde çok yüksek oranda sürgün çoğaltımı elde etmiştir. En yüksek sürgün çoğaltımını, 2 mg/L BAP ile IBA'nın 0.05 ve 0.1 mg/L 'lik ortamlarından ve 2 mg/L BAP ile NAA'nın 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/L'lik ortamlarından veya 8 mg/L BAP ile 0.05 mg/L NAA ortamından elde etmiştir. En yüksek sürgün boyunu yalnızca 2 mg/L BAP'nın bulunduğu ortamda gözlemiştir. Elde edilen sürgünleri 1 mg/L IBA içeren MS ortamında 4 hafta içerisinde %60 oranında köklendirerek, normal bitkiler elde etmeyi başarmıştır. Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, olgun embriyolar 0.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA hormonları bulunan

Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde 5-6 günde %85 oranında gelişme göstererek 8. günde kök oluşumu göstermişlerdir.

Üçler ve Mollamehmetoğlu (2001), büyük yapraklı Ihlamur (*Tilia platyphyllos* Scop.) bitkisinin in vitro koşullarda embriyo kültürü ile bitki rejenerasyonunu araştırmışlar ve bitki büyüme düzenleyicileri bulunmayan, sadece şeker ilave edilen ortamlarda embriyoların epikotil ve kök farklılaşmasını gerçekleştirerek bitkicik oluşturduğunu gözlemişlerdir. Epikotil eksplantları üzerinde tomurcuk oluşumu bakımından 1.0 mg/l BAP dozunun diğer dozlara göre daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Tomurcuk oluşumu bakımından denenen tüm BAP dozları, Kinetin dozlarına göre daha etkili bulunmuştur. Araştırma sonuçlarında, olgun ıhlamur tohumu embriyolarının şekerli ortamlarda çimlendirilerek bitki elde edileceğini ve buradan elde edilen bitki epikotillerinin kültüre alınmasıyla, tomurcukların çoğaltılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada da, NAA ve BAP ilave edilmiş MS besiyeri kullanılmıştır ve embriyo kültürü ile bitki gelişimi sağlanmıştır.

Haliloğlu (2002), embriyonik kallus üretimi için olgunlaşmamış buğday embriyolarını, embriyo kültür yöntemi kullanarak üç embriyonun gelişim aşamasında 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) konsantrasyonunun buğday olgunlaşmamış embriyo kültürünün morfogenesisi üzerine etkilerini araştırmıştır. 2 mg/L 2,4-D' nin embriyogenesise etkisi olan morfogenesis için en iyi oran olduğunu ve kallusun birinci ve ikinci gelişim aşamasında 2 mg L 2,4-D kosantrasyonunda oluştuğunu göstermiştir. Yüksek embriyogenik kallus üretimini MS+B5 besiyerlerinde gözlemiştir. Bizim çalışmamızda, kullanılan MS besiyerinde olgun embriyolar kallus oluşumu gözlenmeden başarıyla gelişmişlerdir.

Çağlayan vd. (1998), Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen salep orkidelerinden *Ocrhis anatolica* Boiss, *Orchis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophyrs phrigra* Fleischm, et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum afine* türlerinde embriyo kültürünü kullanarak in vitro'da kültüre almışlardır. Salep embriyolarının kültüre alınmasında 14 farklı ortam kullanmışlardır. En yüksek ortalama çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranlarını sırasıyla %2.39 ve %1.86 olarak Vaes Debergh + Domates Ekstratı 4 Aktif Karbon ortamında bulmuşlardır. Bu çalışmada belirledikleri amaçları, salep orkidelerinin in vitro koşullarda çoğaltılmaları ve yumru oluşturma oranlarının araştırılarak doğal koşullarda çoğalması oldukça sınırlı

olan bu bitkinin üretilmesinde alternatif bir yöntem bulmaktır. Bizim çalışmamızda, MS besiyerinde %85 oranında embriyo gelişimi görülmüştür.

Tangolar vd. (1999), embriyo kültürü tekniğinin çekirdeksiz üzüm ıslahında kullanılabilme olanaklarının ortaya koymak amacıyla çekirdeksiz x çekirdeksiz üzüm melezlerinden embriyo kültürü yöntemini kullanarak bitki elde etmeyi planlamışlardır. Araştırmada, Sultani çekirdeksiz, Ergin çekirdeksizi, 3A- 261, Perlette, Pembe çekirdeksiz, 2B- 56, Flame Seedless VE King's Ruby çekirdeksiz üzüm çeşitlerini kullanmışlardır. Birinci yılda çeşitlerin çiçek tozu kalite ve üretim miktarlarını saptamışlardır. 2. yılda ise Çekirdeksiz x Çekirdeksiz melezlerinden embriyo kültürü yoluyla bitki eldesine çalışmışlardır. İncelenen çeşitlerin tamamının tozlayıcı bir çeşitte olması gerektiği kadar çiçek tozu canlılık ve çimlenme kapasitesine sahip olduğunu saptamışlardır. Melez kombinasyonlardan embriyo kültürü yoluyla bitki elde edilmesini başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Embriyolardan 2,5 gün ile 9 gün gibi kısa sürede ve %77,1'in üzerinde bir çimlenme saptanmışlardır. Çimlenen embriyolardan %78.9'unun tam bitkiye dönüştüğü görülmüştür. Bizim çalışmamızda, kültüre alınan embriyolar 5-6 günde ve %85 oranında çimlenme göstermişlerdir.

Tangolar vd. (1998), bazı çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin embriyo kültüründen yararlanılarak çoğaltılması ile ilgili bir çalışmada, Perlette, Flame, Seedless, Sultani çekirdeksiz, Pembe çekirdeksiz, 2B–56 ve King's Ruby çeşitlerinden, tam çiçeklenmeden itibaren, 3. ve 8. haftalar arasındaki sürede birer hafta aralarla tane örnekleri almışlardır. Ovül ve embriyoların çimlenmesi üzerine M, Nitsch ve E20A besi ortamlarının etkisini incelemişlerdir. Çimlenme oranlarının, çeşitlerin örnek alma zamanlarına ve kullanılan besi ortamına göre farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. Çekirdeksiz çeşit embriyolarından önemli miktarda bitki elde etmişler ve bu tekniğin çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini saptamışlardır. Çalışmamızda ayçiçeği embriyolarının yüksek çimlenme oranına sahip olduğu gösterilmiştir.

Goldy vd. (1989), *V. vinifera* kalitesinde meyve ve *V. rotundifolia* düzeyinde hastalık ve zararlılara toleranslı bitkiler elde etme amacıyla yaptıkları melezlemelerde embriyo aborsiyonundan kaynaklanması muhtemel yetersiz üretimin arttırılmasında embriyo kültürünün mümkün olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da bitki üretimi embriyo kültür yöntemiyle sağlanmıştır.

Charriere vd. (1999), *Helianthus annuus*'un zigotik embriyolarının in vitro ortamda kültürü ile adventif sürgün ve somatik embriyo oluşumu ile yaptıkları araştırmada, ayçiçeğinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarının aynı tip hücrelerinden sürgün oluşumunun ve somatik embriyo gelişiminin kullanılan medyumdaki şeker konsantrasyonuna bağlı olduğunu görülmüşlerdir.

Freyssinet ve Freyssinet (1988), ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) olgunlaşmamış embriyolardan fertil bitki oluşumunu sağlamışlardır. Olgunlaşmamış embriyoların hipokotillerinden fertil bitki oluşturmuşlardır. Olgunlaşmamış embriyoları, zigotik ve somatik embriyo gelişimine uygun besiyerinde kültüre almışlardır. Besiyerinde sürgün ve kök oluşumunu gözlemlemişlerdir. Genç fideleri toprağa aktarmışlardır. Çalışmamızda olgun embriyolar kullanılarak bitki gelişimi sağlanmıştır.

Myers (2004), *Delonix regia* (Boger)'da somatik embriyogenesisi, olgunlaşmamış tohumların kültürüyle başarmıştır. 2,4-D ve 6 BA içeren iki kültür medyumu oluşturmuştur. İşaretli olgunlaşmamış zigotik embriyolar, olgunlaşmamış tüm tohumlar ve yarısı kesilmiş olgunlaşmamış tohumlar olmak üzere üç farklı eksplant kullanmıştır. Kültürü başarıyla gerçekleştirmiş ve kallusun, medyum ve eksplant tipine göre oluşum gösterdiğini gözlemiştir.

Knittel vd. (1990), olgun ayçiçeği kotiledonlarından yüksek oranda bitki rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarında, ayçiçeğinin doku kültürü çalışmalarının verimlilik, kolay üretim ve güvenilirlik gibi özelliklere bağlı olduğunu açıklamışlardır. Bitki rejenerasyonunda en çok kullanılan yöntemin, olgunlaşmamış embriyolarla çoğaltım olduğunu belirtmişler ve kotiledonlları kullanarak en etkili rejenerasyon yöntemini uygulamışlardır. Bizim çalışmamızda, ayçiçeğinin olgun embriyolarının gelişimi sağlanmıştır.

Birsin vd. (2001), *Avena sativa* L.'da olgun embriyolardan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu incelemiş olup kallus oluşturmada olgun embriyolardan yararlanmışlardır. Yulaf bitkisinde olgun embriyolardan kallus oluşumunun kültüre alındıktan 3 gün sonra başladığını ve kallus oluşumunun genotipe bağlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kullandığımız olgun embriyolardan kallus oluşmadan bitki rejenerasyonu gerçekleşmiş olup 5-6 gün içinde embriyolarda gelişim başlamıştır.

Natalini ve Cavallini (1987), bezelye ile yaptıkları bir çalışmada sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi, genotip ve ortamda bulunan

büyüme düzenleyicileri olduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada da, bitki gelişimini etkileyen en önemli faktörün uygun sıcaklık, nem, içerisinde gerekli büyüme düzenleyicileri ve hormon konsantrasyonları bulunan besiyeri olduğu görülmüştür.

Gürel ve Kazan (1998), ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) etkin bir bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesini amaçlamışlardır. Ayçiçeği hücre veya dokularından etkin bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirmek amacıyla, farklı eksplant tipleri ve hormon kombinasyonlarının kullanıldığı değişik rejenerasyon protokollerini karşılaştırmışlardır. Özellikle alt (bazal) kısımlardan olmak üzere, kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde etmişler, fakat genotipik varyasyonun hem somatik embriyo hem de kök üretimi için en kritik faktör olduğu gözlemlemişlerdir. Sürgün-ucu eksplantlarından sürgün üretimi bakımından 10 farklı ayçiçeği çeşidini karşılaştırdıklarında, söz konusu varyasyonun çok daha belirgin olarak ortaya çıktığını görmüşlerdir. Somatik embriyo üretimini arttırmak amacıyla kültür şartlarının geliştirilmesinin gerekli olduğu sonucuna valmışlardır. Bu çalışmada da bitki gelişimi in vitro kültür şartlarında daha çabuk gerçekleştirilmiş olup, embriyo kültür yöntemiyle kök, gövde ve yaprak oluşumu sağlanmıştır.

Arda (2004), Türkiye Trakya bölgesinde farklı türde hibrit ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nin in vitro şartlarda gelişimi ve kallus oluşum verimiyle ilgili çalışmasında, Trakya bölgesinde yetişen 16 farklı hibrit ayçiçeğini kullanarak üç farklı metot uygulamıştır. Birinci metotda testayı ayırmadan, ikinci metotda ise testayı ayırarak yüzey sterilizasyonu yapmış ve çimlenmeyi gerçekleştirmiştir. Üçüncü metotda çimlenmeyi testayı çıkarmadan nemli pamuk ortamında gerçekleştirmiştir. Kültür çalışmalarını, değişik hormon konsantrasyonlarındaki çeşitli medyumlarda var olan örneklerden alınan eksplantları kullanarak yapmıştır. İstenilen sonuçları, kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kullanılarak yapıldığı kültürlerde almıştır. Bu eksplantlardaki bölümleri inceleyip rejenerasyon ve kallus üretiminin yerli ve hibrit türlerde farklı olduğu sonucuna varmıştır. Çalışmamızda, hibrit ayçiçeğinin yüzey sterilizasyonu yapılmış embriyoları in vitro şartlarda kültüre alınmıştır. Kallus oluşumu gözlenmeden doğrudan bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Mondal vd. (2002), $+4^0$C'de saklanan aksillar tomurcuklardan sürgün çoğalmasıyla çayın (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) üretilebildiğini göstermişlerdir. Çay embriyolarının düşük muhafaza kapasitesine sahip olduğunu açıklamışlardır. Nod

eksplantlarını laboratuvar koşullarında kültürde düşük sıcaklıkta (4^0C) 15, 30, 45 ve 60 gün süreyle MS1'e, sonra hormonsuz MS besiyerine aktarmışlardır. 4^0C'de muhafaza edilmesine rağmen tomurcuk oluşumunun etkilenmediğini gözlemişlerdir. Düşük sıcaklıkta muhafazanın 15 günle birlikte gelişim süresini azalttığını belirtmişlerdir. 4^0C'de tomurcukların 25^0C'de muhafaza edilene oranla daha kısa zamanda (15 günde) geliştiğini açıklamışlardır. Sürgün oluşumu da diğer alt kültürlerde görmüşlerdir. Çalışmamızda, kültür ortamında geliştirilen bitki $+4^0$C' de 30 gün süreyle muhafazaya alındı ve morfolojik olarak değişiklik oluşmadığı gözlendi.

Barbara (2005), germplazm muhafazasında doku kültürünün bitki materyalinin çoklu üretimi, muhafazası, saklanması ve dağılmasında etkili bir yöntem olduğunu açıklamıştır. Eşsiz bitki germplazmını muhafaza etmenin filizlenme, çoğalma ya da bitkiyi yayma açısından, zamandan, yerden ve laboratuvar ihtiyaçlarından kazanç sağladığını belirtmiştir. İn vitro saklanan bitkilerin aylarca, yıllarca muhafaza altında tutulabildiğini ayrıca, bitkilerin 4^0C'de aylarca yeni besiyerine aktarılmadan kalabileceğini açıklamıştır. Az soğuğa toleranslı bitkilerin bile oda sıcaklığında minimal düzeyde muhafaza edilebildiğini belitmiştir. İn vitro saklamanın germplazm muhafazasında kullanıldığını ve bitki genotipine, çoğalabilme özelliklerine bağlı olduğunu, in vitro apikal meristemin çoğalmasının, sağlıklı germplazm stokları için virüssüz bitki eldesinde önemli olduğunu açıklamıştır. Çalışmamız sonucunda da, 4^0C'de muhafazanın bitkide morfolojik olarak bir değişiklik oluşturmadığı ancak, anatomik olarak yapısal değişikliklerin gözlendiği ve embriyo kültür yöntemiyle üretilen bitkilerin de düşük ısıda muhafaza edilebileceği görülmüştür.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, kontrol grubu ve deney grupları arasında bitkilerin gelişimleri esnasında dış morfolojik bakımdan çok fazla farklılığın oluşmadığını göstermiştir. Buna karşılık deney ve kontrol grubu anatomik olarak incelendiğinde bazı farklılıkların oluştuğu, mitotik indeksler açısından ise oldukça anlamlı değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Anatomik değişimlerin nedeni olarak in vitro ve in vivo ortamda yetiştirilen bitkilerde farklı çevresel faktörlerden etkilenme en önemli neden olarak düşünülmektedir. Çünkü, kültür ortamındaki bitkilerde ortamın steril olması, bitkinin su ve besin ihtiyacının en iyi şekilde karşılanması gibi nedenlerden dolayı bitkilerde hücresel gelişim daha hızlı olmakta ancak, hücresel farklılaşma aynı hızda olmamaktadır. Bunun sonucunda da, deney grubu bitkilerinin

gövde anatomik yapısında farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Mitotik aktivite değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda %22.98, deney grubu kültür ortamında yetiştirilende %60.00, deney grubu soğukta muhafaza edilenlerde ise %10.15 olarak bulunmuştur. Normal şartlarda gelişen bitkinin mitotik aktivitesi, ortam şartlarının ve besleme olanaklarının el verdiği ölçüde hücre bölünmesine imkan sağlamasıyla açıklanabilir. Kültür ortamında yetiştirilen bitkilerde oldukça yüksek mitotik aktivitenin görülmesinin nedeni olarak in vitro ortamda bitkilere sağlanmış olan maksimum yaşama şartlarından kaynaklanan etkinin bir sonucu olduğu düşünülebilir. Soğukta muhafaza edilmiş olan bitkilerde mitotik aktivitenin oldukça düşük çıkmış olmasının, düşük sıcaklıkta bitkilerde metabolik aktivitenin, besin ve su alımının yavaşlaması ve alınmış olan su ve besinin iletiminin zorlaşması nedenlerinden oluştuğu düşünülebilir.

Bu bulgulara göre in vitro ve in vivo ortamda yetiştirilen bitkiler ile soğukta muhafaza edilen bitkiler arasında anatomik yapıları ve mitotik aktiviteleri açısından farklılıklar oluştuğu görülmektedir. Ancak bu farklılıkların bitkilerin kültür ortamından normal ortama aktarılmasıyla ortadan kalkabileceği düşünülebilir. Bu nedenle, soğukta muhafaza yöntemi bitkilerin muhafazasında kullanılabilir bir yöntem olarak kabul edilebilir. Daha uzun süreli olarak yapılan çalışmalar ile bu yöntemler geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

AKÇAM OLUK, E. ve DEMİRAY, H., 2001, "Osmotik stresin bitkiler tarafından algılanmasının kallus kültürleri aracılığıyla gösterilmesi" Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi, 25(3): 71-76

ARDA, H., 2004, "In vitro Regeneration and Callus Formation of Different Hybrid of the (Sunflower) *Helianthus annuus* L. Yielding in Turkish Trakya Region" Asian Journal of Plant Sciences, 3(6):747-751.

BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., 2001, "Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları" S. Ü. Basımevi

BARBARA, R., 2005, "Tissue culture for germplasm conservation and distribution" Hortscience, 40:981.

BHOJWANİ, S. and RAZDAN, M., 1996, "Plant Tissue Culture: Theary and Practice" Revised Edition Elsevier Science, 297-335.

BİRSİN, M., ÖNDE, S., ÖZGEN, M., 2001, "Callus Induction and Regeneration from Mature Embryos of Oat (*Avena sativa* L.)" Turkish Journal of Biological, 25:427-434.

BÜRÜN, B., POYRAZOĞLU, E., 2002, "Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.)" Turkish Journal of Biological, 26:175-180.

CHARRIERE, F., HAHNE, G., 1998, "Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators" Plant Science, 137:63-71.

CHARRIERE, F., SOTTA, B., MIGINIAC, E., HAHNE, G., 1999, "Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels" Plant Physiol. Biochem., 37(10):751-757.

CHRAIBI, K., CASTELLE, J.C., LATCHE, A., ROUSTAN, J.P. and FALLOT, J., 1992, "A genotype- independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) The role of ethylene" Laboratoire de Biotechnologie Amelioration des Plantes, France.

ÇAĞLAYAN, K., ÖZAVCI, A., ESKALEN, A., 1998, "Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak İn Vitro Koşullarda Çoğaltılmaları" Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22:187-191.

DUKE, J.A., 1983, "*Helianthus annuus* L." Handbook of Energy Crops.

EKEN, H., 2004, "Ayçiçeği" Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E.– Bakış, Nüsha:11, Sayı:5.

EMİROOĞLU, Ü. ve GÜREL, A., 1993, "Bitki ıslahında modern biyoteknoloji" The Biotechnology Revulation Shourt Course, 8-12.

ERDAĞ, B., YÜREKLİ, K., 2000, "*Thymus sipyleus* Boiss. (*Lamiaceae*)'un İn Vitro Çoğaltılması" Turkish Journal of Biological, 24:Ek sayı81-86.

ERDOĞAN, Y., ÇÖÇÜ, S., PARMAKSIZ, C., SANCAK, C., ARSLAN, O., 2005, "Burçak (*Vicia ervilia* L.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım" Tarım Bilimleri Dergisi, 11(1) 60-64.

FREYSSİNET, M. and FREYSSINET, G., 1988, "Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos,France.

GOLDY, R.G., RAMMING, D.W., EMERSHAD, R. L., CHAPRRO, J.X., 1989, "Increasing production of *V. vinifera* × *V. rotundifolia* hybrids through embryo rescue" Hortscience, 24 (5):820-822.

GOLENIOWSKI, M.E., FLAMARIQUE, C., BIMA, P., 2003, "Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare* × *Applii*) from Meristem Tips" In Vitro Celluler and Development Biology- Plant, Cabi Publishing, 39(2):125-128.

GOMES, G.A.C., PAIVA, R., DUARTE DE OLIVERIRA PAIVA, P., JOSE ARTIAGA DE SANTIAGO, E., 2003, "Plant Regeneration from Callus Cultures of *Maclura tınctoria*, an Endangered Woody Species" In Vitro Cellular and Development Biology- Plant, Cabi Publishing, 39(3):293-295.

GRECO, B., TANZARELLA, O.A., CARROZZO, G. and BLANCO, A., 1985, "Callus induction and shoot rejeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Breeding Institute, Italy.

GU, D.F., WU, X.K., ZHANG, W.Q., 1990, "Factors effecting callus induction and plantlet regeneration in in vitro culture of immature barley embryos" Journal of Jilin Agricultural University, 12 (2):1-6.

GÜREL, E., KAZAN, K., 1998, "Development of an Efficient Plant Regeneration System in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Turkish Journal of Botany, 22:381-387.

HALİLOĞLU, K., 2002, "Wheat Immature Embryo Culture for Embryogenic Callus Induction" OnLine Journal of Biological Sciences, 2(8):520-521.

KAYA, Y., 2004, "Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler ve Islahında Kullanım Olanakları" Trakya University Journal of Science, 5(2):141-147.

KNITTEL, N., ESCANDON, A.S. and HAHNE, G., 1990, "Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons"Institut de Biologie Molecularire des Plantes du CNRS, France.

KOCAÇALIŞKAN, İ., 2002, "Bitki Kültürleri" DPÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü

Lİ, W., MASILAMANY, P., KASHA, K.J., PAULS, K., 2002, "Factors Affecting Plant Regeneration from Shoot Apical Meristems of Germinated *Zea mays* L. Seedlings" In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, Cabi Publishing, 38(3):285-292.

MAMUN, M.A., SIKDAR, M.B.H., PAUL, D.K., RAHMAN, M.M., and ISLAM, M.R., 2004, "In vitro Micropropagation of Some Important Sugarcane Varieties of Bangladesh" Asian Journal of Plant Sciences, 3(6):666-669.

MONDAL, T.K., BHATTACHARYA, A., SOOD, A. and AHUJA, P.S., 2002, "Propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by shoot proliferation of alginate- encapsulated axillary buds stored at 4^0C" Current Science, 83(8):941-944.

MYERS, A., 2004, "Somatic Embryogenesis Induction in *Delonix regia* (Boger.) Raf (Royal Poinciana)" Journal of Undergraduate Research, 5(6).

NAGIP, A., HOSSAIN, S.A., ALAM, M.F., HOSSAIN, M.M., ISLAM, R., and SULTANE, R.S., 2003, "Virus Free Potato Tuber Sees Production Trough Meristem Culture In Tropical Asia" Asian Journal of Plant Sciences, 2(8): 616-622.

NATALİNİ, L. ve CAVALLİNİ, A., 1987, "Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plantles by in vitro culture of immature embryos" Plant Breed, 99: 172-176.

NESTARES,G., ZORZOLI, R., MROGINSKI, L., and PICARDI, L., 2002, "Heritability of in vitro plant regeneration capacity in sunflower" Plant Breeding,121:366-368.

ÖZGEN, M., ALTINOK, S., ÖZCAN, S., SEVİMAY, C.S. ve CAFER, S., 1997, "In vitro micropropogation of Afalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars Turkish Journal Of Botany, 21: 275–278.

PİRİNÇ, V., ONAY, A., YILDIRIM, H., ADIYAMAN, F., IŞIKALAN, Ç., BAŞARAN, D., 2003, "Aventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid Diyarbakır Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. Sürme)" Turkish Journal of Biology, 27:101-105.

PRASERTSONGSKUN, S., 2003, "Plant regeneration from callus cultured of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash)" Songklanakarin Journal of Science Technology, 25(5):637-642.

RAHMAN, M. M., AMİN, M.N., AHAMED, T., ALİ, M. R., and HABİB, A., 2004, "Efficient Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis from Leaf Base-derived Callus of *Kaempferia galanga* L." Asian Journal of Plant Sciences, 3 (6):675-678.

SANCAK, C., 1999, "In Vitro Micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Turkish Journal of Botany, 23: 133–136.

TANGOLAR, S., ETİ, S., GÖK, S., ERGENOĞLU, F., 1999, "Çekirdeksiz × Çekirdeksiz Üzüm Melezlemelerinden Embriyo Kültürü Kullanılarak Bitki Elde Edilmesi" Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 23: Ek sayı4, 935-942.

TANGOLAR, S., GÖK, S., ERGENOĞLU, F., ÇETİNER, S., 1998, "Bazı Çekirdeksiz Üzüm Çeşitlerinin Embriyo Kültüründen Yararlanılarak Çoğaltılması" Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22:87-92.

ÜÇLER, Ö., MOLLAMEHMETOĞLU, N., 2001, "In vitro Plantlet Regeneration from Mature Embryos of Linden (*Tilia platyphyllos* Scop.) and Multiplication of its Buds"Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25:181-186.

VARGAS, T.E., MEJIAS, A., OROPEZA, M., GARCIA, E., 2004, "Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv Rubrun" Electronic Journal of Biotechnology, 7(3)282-286.

VOOKOVA, B., KORMUTAK, A., 2003, "Plantlet Regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* × *Abies nordmanniana* Hybrid via Somatic Embryogenesis" Turkish Journal of Botany, 27: 71–76.

YILDIZ, M., ER, C., 2002, "Increasing the Injured Area on Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Leads to High Frequency Callus-Based Shooot Regeneration" Turkish Journal of Biology, 26:95-98.

ZAMAN, M.S., QURAISHI, A., HASSAN, G., 2001, "Meristem Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.) for Production of Virus-Free Plantlets" OnLine Journal of Biological Scientific Information, 1(10):898-899.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Edirne'nin Keşan ilçesinde doğdum. Ortaöğrenimimi 1999 yılında Yabancı Dil Ağırlıklı Keşan Yusuf Çapraz Lisesi'nde tamamladıktan sonra aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazanarak lisans eğitimime başladım. 2003 yılında lisans programını bitirdim ve aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programına kabul edildim. 2004 yılında Tezsiz Yüksek Lisans Programını tamamladım. Bu süre içinde Boğaziçi Üniversitesi'nde İngilizce kursuna devam ettim ve sertifika aldım. 2004 yılının Eylül ayında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Hücre Biyolojisi bölümünde Tezli Yüksek Lisans Programına kabul edildim.

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER

Şekiller ve çizelgeler **Sayfa**

Şekil 3.1.1. Petri kaplarına ekimi yapılmış embriyolar 24
Çizelge 4.1.1 Kum ortamına ekilen tohumların çimlenme sayıları 27
Şekil 4.1.1. Kum ortamında çimlenmiş fideler 27
Çizelge 4.1.2. Petri kabında gelişen embriyo sayıları 28
Şekil 4.1.2. Seyreltilerek aktarılan embriyoların 5 günlük sürede gelişimi 29
Şekil 4.1.3. Büyük kültür kaplarında gelişme gösteren fideler 29
Şekil 4.1.4. Kültür ortamında 8 günlük periyotta kök oluşumu 30
Şekil 4.1.5. Kültür kaplarında gövde ve yaprak gelişimi 30
Şekil 4.1.6. 30 günlük sürede meydana gelen gelişme 31
Şekil 4.1.7. $+4^0$C'lik düşük ısıda 30 gün süreyle bekletilen bitkiler 32
Şekil 4.1.8. $+4^0$C'lik düşük ısıda bekletilen bitkiler 32
Şekil 4.1.9. $+4^0$C'lik düşük ısıda 30 gün süreyle bekletilen bitkiler 33
Şekil 4.2.1. Kontrol grubu gövde enine kesit (X40) 34
Şekil 4.2.2. Kontrol grubu gövde enine kesit (X100) 35
Şekil 4.2.3. Kontrol grubu gövde enine kesit (X100) 35
Şekil 4.2.4. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X100) 36
Şekil 4.2.5. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X100) 37
Şekil 4.2.6. Deney grubu (kültür ortamında) gövde enine kesit (X200) 37
Şekil 4.2.7. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X100) 38
Şekil 4.2.8. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X100) 39
Şekil 4.2. 9. Deney grubu (soğukta muhafaza) gövde enine kesit (X200) 39
Çizelge 4.3.1. Kontrol grubu kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme sayıları 40
Şekil 4.3.1. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400) 41
Şekil 4.3.2. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 41
Şekil 4.3.3. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 42

Şekil 4.3.4. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 42
Şekil 4.3.5. Kontrol grubu bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 43
Çizelge 4.3.2. Deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde mitoz bölünme sayıları 44
Şekil 4.3.6. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400) 44
Şekil 4.3.7. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 45
Şekil 4.3.8. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 45
Şekil 4.3.9. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 46
Şekil 4.3.10. Deney grubu (kültür ortamı) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 46
Çizelge 4.3.3. Deney grubu düşük ısıda bekletilen bitkilerde mitoz bölünme sayıları 47
Şekil 4.3.11. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X400) 48
Şekil 4.3.12. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 48
Şekil 4.3.13. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 49
Şekil 4.3.14. Deney grubu (soğukta muhafaza) bitkisi kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme gösteren hücreler (X1000) 49