KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ YETİŞTİRME VE ISLAHI

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAYEMİŞ (*Arbutus unedo* L.) GENOTİPLERİNİN İN VİTRO ÇOĞALTIMI

SERDAR MEMİŞ

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ YETİŞTİRME VE ISLAHI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAYEMİŞ *(Arbutus unedo* L.) GENOTİPLERİNİN İN VİTRO ÇOĞALTIMI

SERDAR MEMİŞ

Doç. Dr. Melekber SÜLÜŞOĞLU DURUL
Danışman, Kocaeli Üniversitesi

Doç. Dr. Aysun ÇAVUŞOĞLU
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

Doç. Dr. Bekir ŞAN
Jüri Üyesi, Süleyman Demirel Üniversitesi

Tezin Savunulduğu Tarih: 12.07.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ülkemizde kocayemişte doku kültürü çalışmaları yeni yeni başlamış olup, henüz gelişme sürecindedir. Bu bitkinin kültüre alınması, yaygınlaşması, tüketicinin tanıması ve yurdumuzda yetiştiricilik periyodu içinde yer alması zaman alacaktır. Ancak başta Avrupa olmak üzere diğer kıtalara bakıldığında birçok ülkede kocayemişin hızla artan bir üretim kapasitesinin olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca birçok Avrupa ülkesinde kocayemiş üretimi, geliştirilmesi, çoğaltılması, bakım ve kullanım alanları ile ilgili çalışmalar yükselen bir ivme ile araştırıcılar tarafından devam etmektedir. Bu tez çalışmamızda önümüzdeki yıllarda ülkemizde de önem kazanacağı öngörülen kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) meyvesinin çoğaltılmasında fayda getireceğini düşündüğümüz mikro çoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamızda kocayemiş konusunda yapılan çalışmaların tarihçesi anlatılmaya çalışılmış, daha önceden yapılan çalışmalar ile ilgili olarak teknik bilgiler özet şeklinde aktarılmıştır. Bunun yanında Kocayemişin mikro çoğaltımı ile ilgili olarak çeşitli denemeler kurularak en ideal besin ortamına ulaşmak hedeflenmiştir.

Doku kültürü çalışmaları sabır gerektiren, sebat isteyen, azim ve kararlılıkla yürütülmesi gereken bilimsel çalışmalardır. “Her eksplant bir bebek hassasiyeti ile muamele ister” sözü ve düsturu ile çalışmalarımda beni destekleyen, çalışmam sırasında her türlü bilgi, kaynak ve tecrübelerini paylaşan, çalışma boyunca yardımcı olan Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Melekber SÜLÜŞOĞLU DURUL’a saygılarımı sunar, teşekkürlerimi arz ederim.

Çalışmamın temel taşlarının oluşturulmasında, hayatta ve bilimsel çalışmalarda her türlü yol gösterici eğitim ve bilgi paylaşımlarından dolayı tüm hocalarıma ayrı ayrı en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bilgi ve tecrübeleri ile çalışmamda yardımcı olan Dr. Ceren ÖZCAN’a, mesai arkadaşlarım olan ve desteklerini esirgemeyen Ziraat Yüksek Mühendisi M. Veysel AYHAN ve Ziraat Yüksek Mühendisi Pınar SOYCAN’a, Ziraat Yüksek Mühendisi M. Feridun AZTEKİN’e, doğadan çelik alımı çalışmalarında yardımcı olan Ziraat Mühendisi İsmail EFE’ye teşekkür ederim.

Her konuda, her zaman en yakın destek ve yardımlarını gördüğüm başta annem Nuriye MEMİŞ olmak üzere, ilk öğretmenim olan babam Ferruh MEMİŞ’e ve sevgili eşim Zeynep MEMİŞ’e ve çocuklarım Yavuz S. MEMİŞ ve Eslem Z. MEMİŞ’e gösterdikleri anlayış ve destek için teşekkür ederim.

Temmuz - 2018 Serdar MEMİŞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Kocayemişin Genel Özellikleri 4
1.2. Kocayemişin Besin Değeri ve Kimyasal Bileşimi 5
1.3. Kocayemişte Yürütülen Seleksiyon Çalışmaları 6
1.4. Kocayemişin Çoğaltılması Üzerine Çalışmalar 8
1.4.1. Kocayemişin tohumla çoğaltılması 8
1.4.2. Kocayemişin çelikle çoğaltılması 9
1.4.3. Kocayemişin doku kültürü ile çoğaltılması 10
2. MATERYAL VE YÖNTEM 14
2.1. Materyal 14
2.2. Yöntem 18
2.2.1. Uygun sterilizasyon tekniğinin belirlenmesi 18
2.2.2. İlk dikim aşamasında bitkisel materyalin sterilizasyonu 20
2.2.3. Sürgün gelişimi ve köklenme aşamasında kullanılan besin ortamlarının hazırlanması 20
2.2.4. İlk dikim aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları 23
2.2.5. Alt kültür aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları 23
2.2.6. Çoğaltma aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları 23
2.2.7. Köklendirme aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları 25
2.2.8. Dış koşullara alıştırma (Adaptasyon) çalışmaları 25
2.2.9. İncelenen özellikler ve değerlendirmede izlenen yöntemler 26
2.2.9.1. Sterilizasyon denemesi 26
2.2.9.2. İlk dikim kültürleri 26
2.2.9.3. Alt kültürler 27
2.2.9.4. Sürgün çoğaltma kültürleri 27
2.2.9.5. Köklendirme çalışmaları 27
2.2.9.6. Dış koşullara alıştırma (Adaptasyon) çalışmaları 27
2.2.10. Araştırmada yapılan ölçümler 27
2.2.10.1. Yaşama oranı 27
2.2.10.2. Enfeksiyon oranı 27
2.2.10.3. Kararma oranı 28

2.2.10.4. Yeni sürgün oluşturan eksplant oranı 28
2.2.10.5. Sürgün verimi 28
2.2.10.6. Sürgün uzunluğu 28
2.2.10.7. Uzayan ana eksplant oranı 28
2.2.10.8. Ana eksplantlarda uzama miktarı 28
2.2.10.9. Yapraklarda irileşme 28
2.2.10.10. Köklenme oranı 29
2.2.10.11. Kök sayısı 29
2.2.10.12. Kök uzunluğu 29
2.2.10.13. Köklendirme ortamında kallus oluşumu ve çapları 29
2.2.10.14. Köklendirme aşamasında oluşan sürügünlerin değerlendirilmesi 29
2.2.10.15. Dış koşullara alıştırmada yaşama oranı 29
2.2.11. Kültür koşulları 29
2.2.12. Verilerin değerlendirilmesi 30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 31
3.1. Sterilizasyon Çalışmalarının Sonuçları 31
3.2. Kocayemiş Genotiplerinde İlk Dikim Sonuçları 35
3.2.1. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim sonuçları 35
3.2.2. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim sonuçları 36
3.2.3. Yuvacık 4 genotipinde ilk dikim sonuçları 37
3.2.4. Ulaşlı 1 genotipinde ilk dikim sonuçları 38
3.2.5. Ereğli genotipinde ilk dikim sonuçları 39
3.3. Alt Kültür Çalışmaları 41
3.3.1. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar..... 42
3.3.2. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar..... 45
3.3.3. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar..... 48
3.3.4. Ereğli genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar..... 51
3.4. Sürgün Çoğaltma Çalışmaları 54
3.4.1. MS besin ortamına sürgünlerin çoğaltılması 54
3.4.1.1. Yuvacık 2 genotipinde MS besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar 54
3.4.1.2. Ulaşlı 1 genotipinde MS besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar 56
3.4.2. WPM besin ortamına sürgünlerin çoğaltılması 57
3.4.2.1. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar 58
3.4.2.2. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar 60
3.4.2.3. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar 61
3.5. Köklenme Ortamı Sonuçları 63
3.5.1. MS köklenme ortamı sonuçları 63
3.5.2. WPM köklenme ortamı sonuçları 65

3.5.2.1. Yuvacık 2 genotipinde WPM köklenme ortamı sonuçları..... 66
3.5.2.2. Yuvacık 4 genotipinde WPM köklenme ortamı sonuçları..... 68
3.6. Dış Koşullara Alıştırma (Adaptasyon) Sonuçları..... 71
3.6.1. Yuvacık 2 genotipinde dış koşullara alıştırma aşaması sonuçları..... 71
3.6.2. Yuvacık 4 genotipinde dış koşullara alıştırma aşaması sonuçları..... 71
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 77
KAYNAKLAR..... 82
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER..... 87
ÖZGEÇMİŞ..... 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kocayemiş bitkisinden görüntüler 5
Şekil 2.1. Çalışmada yer alan kocayemiş genotipleri lokasyon haritası..... 14
Şekil 2.2. Çalışmada yer alan kocayemiş genotiplerinin genel görünümü 15
Şekil 2.3. Doğadaki kocayemiş genotiplerden alınan odun dalları 16
Şekil 2.4. Kocayemişlerden alınan odun dallarının çapları..... 16
Şekil 2.5. Laboratuvar koşullarında odun dallarından epikormik sürgün gelişimi 17
Şekil 2.6. Odun dallarından gelişen epikormik sürgünler..... 17
Şekil 2.7. Dikim aşamasına ulaşan epikormik sürgünler 18
Şekil 2.8. Eksplant tipleri 18
Şekil 2.9. Besin ortamı stokları 20
Şekil 3.1. Sürgün ucu eksplantlarında farklı sterilizasyon tekniğinde; yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 33
Şekil 3.2. Boğumlu eksplantlarında farklı sterilizasyon tekniğinde; yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 33
Şekil 3.3. Eksplantlarda görülen kararma durumları 34
Şekil 3.4. Ortamlarda oluşan enfeksiyonların genel görünümü 34
Şekil 3.5. Sağlıklı gelişen eksplantlar 34
Şekil 3.6. İlk dikim aşamasında farklı kocayemiş genotiplerinde sürgün ucu ana eksplantlarının hormonsuz MS besin ortamındaki boylanma durumu 40
Şekil 3.7. İlk dikim aşamasındaki eksplantlar 40
Şekil 3.8. İlk dikim aşamasında farklı kocayemiş genotiplerinde boğumlu ana eksplantların hormonsuz MS besin ortamındaki boylanma durumu..... 41
Şekil 3.9. Kocayemiş genotiplerinde ilk dikimde yaşama ve proliferasyon oranları 41
Şekil 3.10. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı 43
Şekil 3.11. Yuvacık 2 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi 44
Şekil 3.12. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı 46
Şekil 3.13. Yuvacık 4 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi 47
Şekil 3.14. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı 49
Şekil 3.15. Ulaşlı 1 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi 50
Şekil 3.16. Ereğli genotipinde alt kültürlerde sürgün kararması 51
Şekil 3.17. Ereğli genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı 52

Şekil 3.18. Ereğli genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi 53
Şekil 3.19. Yuvacık 2 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi 55
Şekil 3.20. Ulaşlı 1 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi 57
Şekil 3.21. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi 59
Şekil 3.22. Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi 61
Şekil 3.23. Ulaşlı 1 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi 62
Şekil 3.24. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında IBA dozlarında sürgün boyları 64
Şekil 3.25. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında köklenme aşamasında kallus oluşumu 65
Şekil 3.26. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında köklenme aşamasında sürgün boyu gelişimi 65
Şekil 3.27. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında IBA dozlarının köklenmeye etkisi 68
Şekil 3.28. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında NAA dozlarının köklenmeye etkisi 68
Şekil 3.29. Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında IBA dozlarının köklenmeye etkisi 70
Şekil 3.30. Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında NAA dozlarının köklenmeye etkisi 70
Şekil 3.31. IBA eklenen WPM besin ortamında köklendirilen Yuvacık 2 genotipine ait mikro bitkilerin adaptasyon durumu 73
Şekil 3.32. NAA eklenen WPM besin ortamında köklendirilen Yuvacık 2 genotipine ait mikro bitkilerin adaptasyon durumu 73
Şekil 3.33. Yuvacık 4 genotipinde mikro bitkilerin adaptasyon durumu 73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sterilizasyon uygulamaları ve süreleri 19
Tablo 2.2. MS besin ortamı içeriği..... 21
Tablo 2.3. Woody Plant Medium besin ortamı içeriği..... 22
Tablo 2.4. İlk dikim, alt kültür ve sürgün çoğaltma aşamalarında ortamların içerikleri..... 24
Tablo 2.5. Köklendirme aşamasında ortamların içerikleri..... 26
Tablo 3.1. Eksplant tipi ve sterilizasyon tekniğinin yaşama oranı üzerine etkileri 31
Tablo 3.2. Eksplant tipinin ve sterilizasyon tekniğinin enfeksiyon oranı üzerine etkileri ..... .32
Tablo 3.3. Sterilizasyon çalışmalarında kararma oranları..... 32
Tablo 3.4. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 36
Tablo 3.5. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı, sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi 36
Tablo 3.6. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 37
Tablo 3.7. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı, sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi 37
Tablo 3.8. Yuvacık 4 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 37
Tablo 3.9. Yuvacık 4 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı, sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi 38
Tablo 3.10. Ulaşlı 1 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 38
Tablo 3.11. Ulaşlı 1 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı, sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi 39
Tablo 3.12. Ereğli genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları 39
Tablo 3.13. Ereğli genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı, sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi 40
Tablo 3.14. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri..... 42
Tablo 3.15. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi 43
Tablo 3.16. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri..... 45
Tablo 3.17. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi 46
Tablo 3.18. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri..... 48
Tablo 3.19. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi 49

Tablo 3.20. Ereğli genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri 51
Tablo 3.21. Ereğli genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi 52
Tablo 3.22. Yuvacık 2 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişimi üzerindeki etkileri 55
Tablo 3.23. Ulaşlı 1 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişimi üzerindeki etkileri 56
Tablo 3.24. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri 58
Tablo 3.25. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri 59
Tablo 3.26. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri 60
Tablo 3.27. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri 60
Tablo 3.28. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri 62
Tablo 3.29. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri 63
Tablo 3.30. MS besin ortamında IBA dozlarının köklenme üzerine etkisi 64
Tablo 3.31. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında IBA ve NAA dozlarının köklenme üzerine etkileri 66
Tablo 3.32. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında köklenme aşamasında IBA ve NAA dozlarının kallus oluşumuna etkileri 67
Tablo 3.33. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında köklenme aşamasında IBA ve NAA dozlarının sürgün uzamasına etkileri 67
Tablo 3.34. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında IBA ve NAA dozlarının canlılık, köklenme ve sürgün gelişimi üzerine etkileri 69
Tablo 3.35. Yuvacık 2 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı IBA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları 71
Tablo 3.36. Yuvacık 2 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı NAA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları 71
Tablo 3.37. Yuvacık 4 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı IBA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları 72
Tablo 3.38. Yuvacık 4 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı NAA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları 72

Tablo 3.39. Dış koşullara alıştırma aşamasında Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotiplerinde yaşama oranları 72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

^{o}C	:	Derece santrigrat
cm	:	Santimetre
g	:	Gram
l	:	Litre
m	:	Metre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
µM	:	Mikromolar

Kısaltmalar

AND	:	Anderson Besi Ortamı
BA	:	Benzil Adenin
BAP	:	6-Benzil Amino Pürin
EAFRD	:	European Agricultural Fund for Rural Development (Avrupa Kalkınma Fonu Kırsal Kalkınma Birimi)
GA_3	:	Giberellik Asit
HCl	:	Hidroklorik Asit
IAA	:	İndol-3-Asetik Asit
IBA	:	İndol-3-Butirik Asit
KIN	:	Kinetin
KNO_3	:	Potasyum Nitrat
MS	:	Murashige and Skoog Besi Ortamı
NAA	:	Naftalen Asetik Asit
NaClO	:	Sodyum Hipoklorit
NUC	:	Neglected or Underutilized Crop (İhmal Edilen veya Tam Olarak Değerlendirilmeyen Ürün)
pH	:	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
ppm	:	Parts Per Million (Milyonda Bir Birim)
TDZ	:	Thidiazuron
WPM	:	Woody Plant Medium Besi Ortamı
ZEA	:	Zeatin

KOCAYEMİŞ (*Arbutus unedo* L.) GENOTİPLERİNİN İN VİTRO ÇOĞALTIMI

ÖZET

Bu çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin ve besin ortamlarının Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ulaşlı 1 ve Ereğli genotiplerinin in vitro çoğaltılması üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu genotipler Marmara bölgesi Samanlı Dağları lokasyonunda, Kocaeli sınırları içinde seçilmiş olan genotiplerdir. İlk önce kocayemiş için uygun sterilizasyon tekniğinin belirlendiği denemelerde sürgün ucu ve boğumlu eksplantlarda %50 etil alkol ile 1 dakika + %20 sodyum hipoklorit ile 12 dakika uygulaması en uygun sterilizasyon tekniği olarak belirlenmiştir. İlk dikim aşamasında sadece boğumlu eksplantlarda proliferasyon gerçekleşmiştir. Alt kültürlerde proliferasyon oranı genotiplere göre farklılık göstermiş, Yuvacık 2 genotipinde 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 ile Ulaşlı 1 genotipinde 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren MS ortamında en yüksek proliferasyon gerçekleşmiştir (her ikisinde de %88,89). Çoğaltma aşamasında MS ve WPM besin ortamlarında farklı BAP dozlarının etkileri araştırılmıştır. Yuvacık 2 ve Ulaşlı 1 genotiplerinde sürgün çoğaltma aşamasında en iyi sonuçlar WPM besin ortamında 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 kombinasyonundan (sırasıyla %100 ve %55,56), Yuvacık 4 genotipinde ise 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 kombinasyonundan (%44,44) alınmıştır. Köklenme aşamasında Yuvacık 2 genotipi için, 2 mg/l IBA dozu köklenmede en uygun doz olarak belirlenmiş, kök kalitesi bakımından IBA NAA' dan daha üstün performans sergilemiştir. Yuvacık 4 genotipinde, 4 mg/l IBA ve 4 mg/l NAA dozları yakın değerler vermiştir. Çalışmanın her aşamasında genotip farkı açık olarak görülmüş, gerek çoğaltma gerekse köklenme aşamalarında Yuvacık 2 genotipi öne çıkan genotip olmuştur. Adaptasyon aşamasında perlit ve torf (1:1 v/v) karışımı kullanılmıştır. Yuvacık 2 genotipinde adaptasyon aşamasında da başarı oranı artmıştır. IBA dozlarında köklendirilen Yuvacık 2 mikro bitkiciklerinde adaptasyonda yaşama oranı ortalama %42,9 olmuştur. IBA içeren ortamlarda köklendirilen mikro bitkilerin NAA içeren ortamda köklendirilen mikro bitkilere göre, dış koşullara adaptasyon sürecinde yaşama oranı artmıştır.

Anahtar Kelimeler : *Arbutus unedo*, Genotip, Köklenme, Nod Kültürü, Sürgün Ucu Kültürü.

IN VITRO PROPAGATION OF STRAWBERRY TREE (*Arbutus unedo* L.) GENOTYPES

ABSTRACT

In this study, effects of plant growth regulators and basal nutrient medium in vitro propagation of Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ulaşlı 1 and Ereğli genotypes were investigated. These genotypes were selected within the Kocaeli province boundaries as a result of selection study in East Marmara Samanlı mountain region. Firstly, the most suitable sterilization technique was determined for sterilization of plant materials, as 50% ethyl alcohol for 1 minute + 20% sodium hypochlorite for 12 minutes for both of shoot tip and nodal explants. At the establishment stage, proliferation was observed only in the nodal explants. Proliferation rates of shoots have changed according to genotypes in subcultures. The highest proliferation was achieved in the MS medium containing 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA in the Yuvacık 2 genotype and 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA in the Ulaşlı 1 genotype (88,89% in both). The effects of different BAP doses in MS and WPM nutrient media during the shoot multiplication phase were investigated. The best results were obtained in the WPM nutrient media supplemented with 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA_3 in both of Yuvacık 2 and Ulaşlı 1 *Arbutus unedo* L. genotypes (100% and 55,56% respectively), while 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 combination gave the best results (44,44%) in WPM nutrient medium for Yuvacık 4 genotypes. 2 mg/l IBA was determined to be the most appropriate dose for rooting of Yuvacık 2 genotype. IBA is also more effective than NAA in terms of root number and elongation in rooting stage. Yuvacık 4 genotype gave the close rooting values in doses of 4 mg/l IBA and NAA. Genotypes effects was clear in each stage of experiments and as a result of this, Yuvacık 2 genotype gave more successful results for multiplication and rooting stages. Infection and browning was occurred at the all stages of cultures and clear differences were observed between genotypes. In the adaptation phase, a mixture of perlite and peat (1:1 v/v) was used as a media. The most succeed genotype Yuvacık 2 gave the 42,9% adaptation rate to acclimatization conditions. Survival rates were increased in shoots rooted in IBA-containing media compared to shoots rooted in NAA-containing media in acclimatization conditions for both of genotypes Yuvacık 2 and Yuvacık 4 micro plantlets.

Keywords: *Arbutus unedo*, Genotype, Rooting, Nod Culture, Shoot Tip Culture.

GİRİŞ

Türkiye, coğrafyası itibariyle kültür bitkilerinin yetiştiriciliğine uygunluğunun yanı sıra, birçoğunun da gen kaynağı durumundadır. Meyvecilik açısından da önemli bir konuma sahip olup, adeta meyvecilik kültürü ve gen kaynağının tarihi bir müzesi görünümündedir (Gerçekcioğlu ve diğ., 2014).

Günümüzde kültüre alınmış, yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan türlerin yanı sıra, her ülkenin doğal florasında yabani formda yayılış gösteren, ancak henüz yeterince bilinmeyen, doğadan toplanarak tüketilebilen meyve türleri bulunmaktadır. Besin ve ekonomik değeri yüksek olan bu türlerin tanınması, kültüre alınıp üretimlerinin yapılması ve kullanım alanlarının genişletilmesi ülkelerin tarım politikaları içinde yer almaktadır. Ekonomik olarak üretimi yapılmayan, ülkemizde henüz tohumdan fidan üretimi başlayan türlerden biri olan kocayemiş, değerli bir potansiyel ile karşımıza çıkmaktadır. Kocayemiş Akdeniz iklimine sahip birçok ülkede olduğu gibi, bizim ülkemizde de doğal olarak maki florası içinde yer almaktadır. Kullanılmayan Türler İçin Küresel Yaygınlaştırma Birimi (Global Facilitation Unit for Underutilized Species) tarafından kocayemiş, ihmal edilen ve tam olarak değerlendirilmeyen ürünler (Neglected or Underutilized Crop) listesine dahil edilmiştir ve ekonomik önemine vurgu yapılmıştır (Gomes ve diğ., 2010, URL-1). Avrupa Birliği Tarım ve Kırsal Kalkınma Politikaları'nca (EAFRD - European Agricultural Fund for Rural Development-2013) önemi artacak bitkiler listesi içine kocayemiş bitkisi de dahil edilmiştir. Dünya genelinde alternatif ürünlerin önemi giderek yükselen bir değerdir ve içinde kocayemişin de olduğu bazı alternatif türler araştırmalara konu olmakta, yaygınlaşması ve üretimi için çalışmalar yürütülmektedir (URL-2).

Kocayemişin farklı kısımları çok farklı alanlarda değerlendirilmektedir. Meyveleri doğadan toplanarak yöresel pazarlarda taze meyve olarak tüketicilere sunulmaktadır. Yine meyveleri özellikle jöle, pasta yapımı ve süslemede değerlendirmektedir. Portekiz'de "Medronheira" adı ile kocayemişten imal edilen özel bir içeçek yaygındır. Tıpta ve ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Çit bitkisi olarak kullanılmakta, sık yapraklı ve dayanıklı sürgünleri çiçekçiler tarafından aranjman ve

çelenk yapımında tercih edilmektedir. Ağacı bonsai üretiminde kullanılmaktadır. Çiçekleri bal üretiminde önemli nektar kaynağıdır. Gövde kabuğu deri tabaklamada değerlendirilirken, odunu pipo, kase, mobilya vs. yapımında kullanılmaktadır. Sert ve ağır odunu yakacak olarak ve kömür üretiminde kullanılmaktadır. (Ayaz ve diğ., 2000; Çelikel, 2005).

Kocayemiş kendi doğal ortamında tohumlarıyla yayılım göstermektedir. Fidancılar tohumlarıyla fidan üretmektedir. Çelikle üretimi zor olan türler arasındadır. Kocayemişin doku kültürü ile üretimi konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Karadeniz ve Şişman, 2003; Metaxas ve diğ., 2004; Hammani ve diğ., 2005; Onursal ve Gözlekçi, 2007; Gomez ve Canhoto, 2009).

Ülkemizde kocayemiş ile ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar genellikle araştırıcıların bulundukları bölgelerde doğada bulunan kocayemiş türlerinin seleksiyonu, tohum ve çelikle çoğaltılması, besin değeri ve kimyasal bileşimi üzerine yürütülmüştür. Kocayemişin doku kültürü ile çoğaltılması üzerine yok denecek kadar az çalışma yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, Sulusoglu ve diğerleri (2011) tarafından Doğu Marmara Samanlı Dağları bölgesinde gerçekleştirilen seleksiyon çalışması sonucunda belirlenen kocayemiş genotiplerinin doku kültürü ile çoğaltılma olanakları araştırılmıştır. Çalışmaya Kocaeli İlinin Başiskele İlçesi sınırlarında bulunan Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Gölcük İlçesinde yer alan Ulaşlı 1 ve Karamürsel İlçesi sınırları kapsamında olan Ereğli genotipleri olmak üzere 5 genotip dahil edilmiştir. MS (Murashige & Skoog, 1962) ve WPM (McCown & Lloyd, 1981) temel besin ortamlarında, farklı bitki büyüme düzenleyicileri dozlarının sürgünlerin çoğaltılması ve köklenmesi üzerine etkileri incelenmiş, köklü sürgünlerin dış koşullara adaptasyonu değerlendirilmiştir.

Bir türün tanınmasının yanı sıra, kaliteli ve ekonomik şekilde fidan üretiminin yapılması büyük öneme sahiptir. Günümüzde fidanlıklarda tohumlardan elde edilen kocayemiş fidanlarının satıldığı saha çalışmalarımızda tespit edilmiştir. Ancak ekonomik değere sahip kapama bahçelerin kurulabilmesi için fidan üretiminin homojen yapıya sahip olan ve özellikleri bilinen genotiplerden yapılması; fidan üretiminin ise seri ve ekonomik olması gerekmektedir. Çalışmamızda temel amaç

kocayemiş bitkisinin in vitro şartlarda çoğaltımı ve köklendirilmesinde kullanılabilecek ortamların tespit edilmesidir. Böylelikle kocayemiş türünün kültüre alınması sürecinde hızlı ve seri üretimde kullanılabilecek protokollerin oluşturulması, genotiplerin in vitro şartlarında performans durumlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kocayemişin Genel Özellikleri

Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.), *Ericales* takımı, *Ericaceae* (Fundagiller) familyası, *Arbutoideae* alt familyası ve *Arbutus* cinsine ait olup, Akdeniz ekosisteminin karakteristik türlerinden birisidir (URL-3). "Compacta", "Elfin King", "Rubra" gibi ticari öneme sahip değerli çeşitleri de vardır (URL-5; Sakaldaş 2012).

Kocayemiş coğrafik olarak geniş bir yayılıma sahip olup, Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde kızılçam ormanlarında ve maki vejetasyonunda meşeler, yabani zeytin ağaçları, mersin ağaçları ve fundalıklar gibi pek çok ağaç ve çalımsı tür ile birlikte yetişmektedir (Karadeniz ve diğ., 1996). Anavatanı olarak, Anadolu'nun da içinde yer aldığı Yunanistan, Lübnan, İrlanda ve Güney Avrupa gösterilmektedir (Karadeniz ve Şişman, 2003).

Karadeniz bölgesinde; Düzce, Bolu, Sinop, Trabzon, Ordu, Giresun, Zonguldak, Samsun, Artvin illerinin sahil ve yüksek kesimlerinde, Marmara bölgesinde; Çanakkale, Balıkesir, Bursa, Kocaeli, Sakarya, İstanbul ve Trakya'da, Akdeniz bölgesinde; Mersin, Hatay, Kahramanmaraş'ın Baş Konuş Dağında (300-500 metre yükseklikte), Ege bölgesinde; İzmir çevresinde, Muğla ve Antalya'da yetişmektedir (Davis, 1978; Karadeniz ve diğ., 1996; Ayaz ve diğ., 2000; Varol, 2003; Zenginbal ve Gündoğdu, 2016).

Kocayemiş; herdem yeşil, küçük ağaç ya da çalı formunda, genellikle 1,5-3 m yüksekliğe ulaşabildiği gibi 9 metreye kadar boylanabilen ağaçlar oluşturmaktadır. Yaprakları 5-10 cm uzunluğunda, epiliptik yapıda, yaprak uçları sivri olup, kenarları keskin şekilde dişlidir (Anşin ve Özkan, 1993; Şeker ve diğ., 2004; Çelikel, 2005). Çiçekleri beyaz veya açık pembe renkli, çan veya testi şeklinde, 8-9 mm uzunluğunda bileşik salkımda toplanmış olarak bulunurlar. Çiçek salkımı 3-10 cm uzunluğunda, dal uçlarında sarkık şekilde bulunur ve genellikle 15-40 çiçekten oluşur. Çiçeklenme eylülden mart ayına kadar devam eder (Tutin ve diğ., 1981, Anşin ve Özkan, 1993; Sulusoglu ve diğ., 2011, URL-4).

Meyveleri 1-8 gram ağırlığında, kırmızı renkte, yuvarlak veya uzun-oval olup, dış yüzeyi pürüzlüdür. Meyve tamamen olgunlaştığında çok özlü tropikal meyve yapısında ve hoş bir lezzete sahiptir. Meyveler olgunlaşmalarını 1 yılda tamamlarlar. Ağaç üzerinde olgun meyveler ve çiçekler aynı zamanda bulunurlar (Karadeniz ve diğ., 1996; URL-4). Kocayemişin çiçekleri ve meyveleri şekil 1.1'dedir.



(a) (b)

Şekil 1.1 Kocayemiş bitkisinden görüntüler, a) çiçekler, b) meyveler

1.2 Kocayemişin Besin Değeri ve Kimyasal Bileşimi

Kocayemiş içeriğindeki önemli biyoaktif bileşenler dolayısı ile kanser ve kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığa karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Ötleş, 2015).

Ayaz ve diğerleri (2000) tarafından yapılan çalışmada, Samsun ve çevresinden toplanan kocayemiş meyvelerinin kimyasal bileşimi incelenmiş, uçucu olmayan asitler, eriyebilir şekerler ve fenolik asitler içerdiği ve bunların meyve tadına katkıda bulundukları belirtilmiştir.

Güleryüz ve diğerleri (1995) yaptıkları çalışmada kocayemiş meyvelerinin C vitamini oranının çilek ve portakala göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Kıvçak ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmada, kocayemiş yapraklarının yağ asit içeriği belirlenmiş, yaprak yağının %76,7'sini oluşturan 37 adet bileşik tespit edilmiştir. Kıvçak ve Mert (2001) Çiçekliköy'de (İzmir) yılın farklı zamanlarında

kocayemişlerden topladıkları yapraklarda en yüksek E vitamini miktarını mart ayı örneklerinde tespit etmişlerdir.

Pabuçcuoğlu ve diğerleri (2003) kocayemiş yapraklarının ekstraksiyonunda (ethanol ve methanol) E vitamini, fenol ve flavanol glikozitler, tanenler tespit etmişlerdir.

1.3. Kocayemişte Yürütülen Seleksiyon Çalışmaları

Doğada kendiliğinden yetişen kocayemişlerin içinde oldukça lezzetli meyvelere sahip olanların yanında, lezzet ve aroma miktarı düşük olan genotipler de bulunmaktadır. Ekonomik değere sahip genotiplerin seleksiyonu önemlidir.

Karadeniz ve diğerleri (1996) tarafından Trabzon (Yomra) çevresinde doğal olarak bulunan kocayemiş tiplerinin meyve özelliklerine bakılarak 17 tip belirlenmiş, bu tiplerden 5 tip ümitvar olarak belirtilmiştir.

Karadeniz ve Şişman (2003) Trabzon ve çevresinde bulunan kocayemiş tiplerinin meyve özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada 46 tip belirlenmiş, incelenen tipler arasında meyve iriliğine göre geniş bir varyasyon olduğu tespit edilmiştir. Kocayemiş tiplerinden biri odun çelikleriyle iki farklı zamanda köklenmeye alınmış, ancak köklenme elde edilememiştir. Karadeniz ve Şişman (2003) Giresun Merkez'de yetiştirilen bir kocayemiş tipinin biyolojik özellikleri üzerinde çalışmışlar, tahmini ağaç yaşı, sürgün çapı, gövde çapı, yaprak alanı, sürgün uzunluğu ve kimyasal özelliklerini tespit etmişlerdir.

Yarılgaç ve İslam (2007) tarafından Ünye yöresindeki kocayemişlerin bazı pomolojik özellikleri incelenmiş, bu çalışmada 12 kocayemiş tipinin ümitvar olduğu bildirilmiştir.

Sakaldaş (2012) tarafından yürütülen çalışmada, Çanakkale florasında bulunan kocayemiş populasyonunun fenolojik, pomolojik, ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlara göre; Atikhisar ve Umurbey yörelerine ait kocayemiş bitkilerinde çiçeklenme zamanı ve meyve tutum zamanı arasında önemli farklılıklar görülmediği, bunun yanında her iki bölgeye ait bitkilerde çiçek ve kocayemiş meyvelerinin pomolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir.

Pekdemir (2010) tarafından Giresun ili Espiye ve Bulancak ilçelerinde yetişen kocayemişlerin fenolojik ve pomolojik özelliklerinin incelendiği çalışmada, meyve ağırlıkları 2,28 gram ile 11 gram, suda çözünebilir kuru madde içerikleri (SÇKM) %24-31, pH 3,64-4,10 arasında, titre edilebilir asit içerikleri (TEA) %0,77-1,19 arasında bulunmuştur.

Şeker ve diğerleri (2004) Çanakkale Merkez ve Ayancık, Çan, Lapseki ilçelerindeki ormanlık alanlarda doğal yayılım gösteren 200 adet kocayemiş ağacını meyve ağırlıklarına göre 8 gruba ayırarak bitki ve meyve özelliklerini incelemişlerdir. Kocayemişin C vitamini içeriğinin zenginliği ve farklı özellikleri bildirilmiştir.

Çelikel (2005) tarafından Sinop Merkez, Ayancık, Gerze ve Erfelek ilçeleri ve Samsun Yakakent ilçesinde doğal florada yetişen kocayemişler içinde seleksiyon çalışması yapılmış, çalışmada 5 tip ümitvar olarak bulunmuştur.

Sulusoglu ve diğerleri (2011) tarafından Doğu Marmara Samanlı Dağları lokasyonunda doğal olarak yetişen kocayemiş tipleri taranmış, çalışmada farklı özeliklere sahip 37 kocayemiş genotipi tartılı derecelendirme metodu ile seleksiyona tabi tutulmuş ve ümitvar 5 genotipte meyve ağırlığı 3,67-6,46 g olarak ölçülmüştür.

İslam ve Pehlivan (2016) tarafından yapılan çalışmada; Marmara adasında yetişen kocayemişlerin pomolojik özellikleri incelenmiştir. Bölgede 40 adet genotip belirlenmiş, yapılan incelemeler sonunda 4 genotipin ümitvar olduğu bildirilmiştir.

Zenginbal ve Gündoğdu (2016) tarafından yapılan çalışmada; Zonguldak iline bağlı Kilimli beldesi ile Alaplı ilçesi ve Düzce ili Akçakoca ilçesinde doğal olarak yetişen kocayemiş genotiplerine ait meyvelerin fizikokimyasal karekterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada meyve ağırlığının, meyve eninin ve meyve boyunun sırasıyla 3,39-7,25 g, 17,75-23,18 mm, 17,57-23,18 mm arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Ersoy (2017) tarafından Sakarya florasında yetişen kocayemişlerdeki seleksiyon çalışmasında birinci yıl 70 adet kocayemiş genotipi, ikinci yıl ise 50 adet kocayemiş genotipi üzerinde çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda çeşitli özellikleri incelenen kocayemiş genotipleri içinden 5 adet genotipin diğer genotiplerden üstün özellikler taşıdığı belirlenmiştir.

1.4. Kocayemişin Çoğaltılması Üzerine Çalışmalar

Günümüzde fidanlıklarda kocayemişin çoğaltılması genellikle tohum ve çelik ile yapılmaktadır (Giordani ve diğ., 2005). Tohumla çoğaltma genetik açılım sonucunda istenen özelliklerin kaybolması nedeniyle istenen sonuçları sağlayamamaktadır. Kocayemişte çoğaltma olgun bitkilerden alınan çeliklerle yapıldığında, köklenme oranı oldukça düşmektedir (Mereti ve diğ., 2002; Metaxas ve diğ., 2004). İn vitro çoğaltmada ana bitkilerle aynı özellikleri taşıyan bitkiler elde edilebilmekte, hızlı bir çoğaltım sağlanmaktadır. Doku kültüründe aksiller sürgün çoğaltımı *Ericaceae* familyası içindeki türlerde klonal çoğaltma için en yaygın kullanılan metottur (Gomes ve Canhato, 2009).

1.4.1. Kocayemişin tohumla çoğaltılması

Pipinis ve diğerleri (2017), farklı 3 bölgeden topladıkları kocayemiş genotiplerine ait tohumların çimlenmesi üzerine giberellik asit ve soğuk katlamanın etkilerini inceledikleri çalışmada, katlama yapılmayan ve GA_3 uygulanmayan tohumlarda çimlenme oranının çok düşük olduğunu, 1 ay soğuk katlama yapılan veya 2000 ppm GA_3 uygulanan tohumlarda yüksek oranda çimlenme elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Giordani ve diğerleri (2005) tarafından yapılan kocayemiş tohumlarının in vitro koşullarda çimlendirildiği diğer bir çalışmada 22,2 µM BA eklenen WPM besin ortamında aksiller sürgün gelişimi bakımından genotipler arasında farklılıklar belirlenmiştir. Köklenme aşamasında mikro sürgünlerin sürekli olarak IBA içeren ortamlarda tutulmasındansa, 0,3 veya 0,6 mM IBA'ya 15 dakika batırıldıktan sonra hormonsuz ortamda köklenmeye alınmasının daha etkili olduğu saptanmıştır.

Günaydın (2005) tarafından *Arbutus unedo* L. türüne ait İzmir koşullarında yetişen bir bitkiden alınan tohumların dormansi probleminin çözülmesi amaçlanarak 14 değişik besin ortamında çimlendirilme işlemi yapılmıştır. En düşük kontaminasyon oranları tohumlar için %70'lik etil alkolde 3 dakika, %2,5'luk sodyum hipokloritte 5 dakikalık uygulama olarak bulunmuştur. Tohumlar, aydınlık koşullarda, farklı konsantrasyonlarda BAP (3 mg/l, 5 mg/l), KIN (3 mg/l, 5 mg/l) içeren MS ve WPM yarı katı besin ortamlarında ayrıca su, sıvı MS, sıvı WPM ile ıslatılmış pamuklu

ortamlarda çimlendirilmek üzere kültüre alınmışlardır. En iyi çimlenme WPM ile ıslatılmış pamuklu ortamda %97 olarak belirlendiği ifade edilmiştir.

Ertekin ve Kırdar (2010) tarafından *Arbutus unedo* L. tohumlarında dinlenmenin kırılması ve çimlenmenin hızlandırılması için yapılan çalışmada, 4 ºC sıcaklıkta 60 gün katlama süresi sonunda %92 oranında çimlenme sağlanmıştır.

Arbutus unedo L. ve *Arbutus andrachne* L. tohumlarının çimlenmesi üzerinde çalışan Köse (1998), 24 saat boyunca 400 ppm GA_3 uygulanan kocayemiş tohumlarında 20º C'de 30 gün içerisinde yüksek oranda çimlenme elde etmiştir.

Tilki (2004) tarafından kocayemiş tohumlarında dormansiyi kırmak için yapılan çalışmada, tohumlara farklı süre ve dozlarda GA_3 ve KNO_3 uygulaması yapılmıştır. GA_3 uygulamasında 300, 600 ve 900 mg/l dozların 9 ve 12 haftalık katlama süresinde kocayemiş tohumlarında dormansinin kırılmasında başarılı sonuçlar verdiği, KNO_3 uygulamasında ise çimlenmede artış olmadığı bildirilmiştir.

1.4.2. Kocayemişin çelikle çoğaltılması

Pignatti and Crobeddu (2005) yaptıkları çalışmada kocayemişte çelik ile çoğaltmada başarı oranının %50'lerde kalmakta olduğunu ve başarılı köklenme için ana bitkinin sürekli budanarak kuvvetli gelişen genç sürgünlerden materyal sağlanması gerekmekte olduğunu belirtmişlerdir.

Şeker ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışmada; kocayemiş populasyonunun seçilmiş bitkilerinden farklı dönemlerde alınan yeşil ve yarı odunsu çeliklerinde IBA, NAA ve IBA + NAA büyüme düzenleyicilerinin köklenme durumu üzerine etkileri belirlenmiştir. Çanakkale'nin Ayvacık, Çan, Eceabat, Merkez ve Lapseki yörelerinde doğal olarak yetişen kocayemiş tiplerinden farklı dönemlerde (2006 ve 2007 yıllarının haziran, temmuz ve ağustos ayları) alınan yeşil ve yarı odun çelikleri, farklı IBA, NAA veya IBA + NAA dozları ile muamele edilerek, perlit ortamında köklenmeye alınmıştır. Araştırma bulgularına göre en iyi sonuçlar, 6000 ppm IBA uygulamasından elde edilmiş, kontrol ve NAA uygulamalarından köklenme sağlanamamıştır. Ayrıca, IBA'nın 4000 ppm'lik çözeltisi ile IBA 4000 ppm + NAA 2000 ppm uygulamaları da kocayemiş çeliklerinde köklenme sağlamıştır.

Suluşoğlu ve diğerleri (2011) tarafından yapılan seleksiyon çalışmasında seçilen genotiplerin çelik ile çoğaltılması amacıyla yürütülen araştırmada, 8 kocayemiş genotipinden temmuz ve kasım döneminde alınan yarı odunsu çeliklere 2, 4, 6, 8 ve 10 g/l IBA dozları uygulanarak köklendirme çalışması yapılmıştır. Ulaşlı 1 genotipinde temmuz çeliklerinde %53,15; kasım çeliklerinde ise %15,37 oranında köklenme elde edilirken, YV3 genotipinde temmuz çeliklerinde %3,15 gibi çok düşük bir köklenme, kasım çeliklerinde ise %23,52 oranında köklenme oluşmuştur. İki genotipte de hem genotip etkisinin köklenmede önemli olduğu, hem de mevsimsel farklılıkların etkisi açık olarak görülmektedir. Diğer bir çalışılan genotip Ereğli'de ise temmuz ayında %17,05; kasım ayı çeliklerinde ise %16,67 köklenme değerleri kaydedilmiştir. Bu genotipte mevsimsel fark bulunmazken, genotip farkı açıktır.

1.4.3. Kocayemişin doku kültürü ile çoğaltılması

Doku kültürlerinde bitkisel materyalin sterilizasyonu ilk aşamadır ve başarıyı doğrudan etkilemektedir. Kültür ortamına dikilen eksplantlarda fenolik madde kaynaklı kararmalar, vitrifikasyon oluşumu, anormal sürgün gelişimi diğer karşılaşılan sorunlardandır.

Kontaminasyon sorunu yaşanan bir tür olan kocayemiş doku kültürlerinde, doğadan toplanan materyallerde olası bulaşık etmenlere karşı fungusit uygulanarak ön dezenfeksiyon yapılmış, ardından epikormik sürgünlerde %75 etanol ile 2 dakika ardından %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi (aktif madde oranı %5) içinde 3-6 dakika sterilizasyon uygulanmıştır (Gomes ve Canhato, 2009).

Kültürler sırasında oluşabilen fenolik oksidasyonu ve doku nekrozlarını önlemek için kültürler 25±1 C sıcaklıkta karanlık koşullarda bir hafta bekletildikten sonra aydınlık ortama alınmıştır (Gomes ve Canhato, 2009). Sürgün ucu ve boğum (nod) eksplantlarında enfeksiyon bakımından bir fark oluşmamış, ancak sürgün uçlarında doku nekrozları önemli oranda azalmış ve yaşama oranı artmıştır.

Mereti ve diğerleri (2002) tarafından yapılan çalışmada doku kültüründe eksplant yaşının başarıyı etkileyen bir diğer unsur olduğu belirtilmiş, kocayemiş

genotiplerinin tohumlarından elde edilen genç çöğürlerden sağlanan materyallerle doku kültürü yapılarak başarı elde edilmiştir.

Gomes ve Canhato (2009), seleksiyon çalışması sonucunda belirlenen kocayemiş genotiplerinin in vitro çoğaltımı üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada, tıraşlama kesim sonrasında olgun bitkilerden yeniden süren sürgünler ve kesilmiş dallardaki uyur gözlerden sürdürülen epikormik sürgünler kullanılmıştır. Epikormik sürgünlerin daha başarılı sonuçlar verdiği, sürgün ucu eksplantlarının boğumlu eksplantlara göre kültürler sonunda çoğaltma bakımından daha verimli olduğu ortaya konmuştur. 9,0 µM BA ilave edilen MS mikro besin elementleri ile hazırlanan FS besin ortamı en yüksek çoğaltma oranını sağlamıştır. Genotipler arasında proliferasyon oranı bakımından farklılığın belirlenmediği çalışmada, sürgün gelişimleri bakımından farklılıklar görülmüştür. Mikro sürgünlerin köklenmesinde sorun oluşmamış, büyüme düzenleyici içermeyen kontrol ortamlarında da köklenme elde edilmiş, oksin varlığı köklenmeyi artırmıştır. Kullanılan besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri başarı oranını etkileyen önemli faktörlerdir. Çalışmada köklenen mikro sürgünlerin dış koşullara alıştırma aşamasında ise ortalama %84,7 oranında başarı elde edilmiştir.

Morini ve Fiaschi (2000) *Arbutus unedo*'nun in vitro çoğaltımında 2,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l GA_3, köklenme aşamasında ise 0,06 mg/l IBA dozlarında başarılı sonuçlar almışlardır. Kültür ortamlarına 30 g/l sakkaroz eklenmiştir.

Mereti ve diğerleri (2002) 22,2 µM BA içeren WPM besin ortamında kocayemiş sürgün ucu kültürlerinden başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Çoğaltılan sürgünler 10 µM IBA veya 10 µM IAA içeren ortamlarda köklendirilmiş, IBA daha yüksek köklenme oranları oluşturmuştur. Elde edilen mikro bitkiciklerin adaptasyon aşamasındaki yaşama oranları %22-55 gibi düşük olmuştur. Aynı çalışmada, 10 µM IAA içeren köklenme ortamına (1:4 v/v) torf:perlit karışımı ilave edilmesi ile bol saçak köklü bitki oranı artmış ve bu bitkiler adaptasyon aşamasında da başarılı sonuçlar vermiştir.

Günaydın (2005) tarafından İzmir koşullarında yetişen kocayemiş ağacından alınan tohumlardan çimlendirme yapılmıştır. Elde edilen sürgün nod eksplantları ise farklı konsantrasyonlarda BAP (3 mg/l, 5 mg/l) ve KIN (3 mg/l, 5 mg/l) içeren MS ve

WPM besin ortamlarında sürgün elde etmek için kültüre alınmışlardır. En iyi sürgün gelişimleri 5 mg/l BAP ve 5 mg/l BAP + 5 mg/l KIN içeren WPM besin ortamlarında gözlenmiştir. Elde edilen sürgünler, köklendirme çalışmaları için değişik konsantrasyonlarda sukroz (0, 15 ve 30 g/l), IBA (0 - 0,5 mg/l) ve aktif karbon (0, 150 mg/l) içeren 12 farklı WPM ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi kök gelişiminin 15 g/l sukroz ve 0,5 mg/l IBA içeren WPM ortamında %100 olarak gözlemlendiği belirtilmiştir.

Bertsouklis ve Papafotiou (2009) tarafından *Arbutus andrachne* L. için mikro çoğaltım protokolünün geliştirilmesi üzerine yürütülen çalışmada, doğal olarak yetişmiş olgun ağaçlardan alınan boğumlu gövde eksplantları; 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l thiamin, 0,5 mg/l nikotinik asit ve 0,5 mg/l pyridoksin eklenen WPM tuzlarında kültüre alınmış, ancak sürgün uzaması sağlanamamıştır. WPM ortamına zeatin, 2ip (2-izopentiladenin), BA veya kinetin eklenmesi sürgün gelişimini tetiklemiştir. Zeatin ve 2ip, BA ve kinetine göre daha iyi sonuçlar vermiştir. BA ve kinetin içeren ortamlarda sürgünlerde yeterli boylanma olmamıştır.

Yetişkin kocayemiş genotiplerinin mikro çoğaltımı ile ilgili olarak Gomes ve diğerleri (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; BA ile birlikte veya ayrı olarak BA'nın çeşitli sitokinin tipleri ile etkileri ve BA + NAA kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kocayemişte mikro çoğaltım başarısının bitki gelişim düzenleyicilerinin tipine ve dozuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir.

El Sayed El Mahrouk ve diğerleri (2010) tarafından kocayemişte adventif sürgün gelişimi ve somatik embriyogeneze yönelik yapılan çalışmada, 12 yaşındaki yetişkin kocayemiş ağacından yarı odunsu dokuda boğumlu segmentler alınmış, 6 hafta süresince hormonsuz MS besin ortamında kültüre alınarak aksiller sürgün gelişimi sağlanmıştır. Elde edilen aksiller sürgünler 0-4 mg/l TDZ dozlarından birini içeren ortamda çoğaltılmış, en iyi sonuçlar 3 mg/l TDZ içeren ortamdan sağlanmış, eksplant başına 3,9 adet sürgün elde edilmiştir. Çoğaltılan in vitro aksiller sürgünlerinin boğum arası kısımları farklı büyüme düzenleyici maddeler içeren MS besin ortamında kültüre alınmış, 14 gün süresince kallus gelişimi sağlanmış, kallus başına 17 adet somatik embriyo gelişimi olmuştur. Embriyonik olmayan kallus

kümelerinden adventif sürgünler gelişmiş, 2 mg/l BA ve 0,5 mg/l NAA dozları 5,3 adventif sürgün gelişimi ile en başarılı ortam olarak belirlenmiştir.

Bertsouklis ve Papafotiou (2013) tarafından yapılan çalışmada; *Arbutus unedo, Arbutus andrachne* ve bu iki türün doğal hibriti olan *A. andrachnoides*'in ½ kuvvetinde MS besin ortamında çimlendirilen 2 aylık genç çöğürlerinden alınan tek boğumlu eksplantlar, 1 mg/l IBA içeren MS veya WPM başlangıç ortamına dikilmiştir. Oluşan çoklu sürgünler 0,2 ve 2 mg/l thidiazuron (TDZ) veya 2,5 ve 5 mg/l zeatin (ZEA) dozlarından birisi eklenen MS veya WPM besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Hormonsuz MS ve WPM ortamları kontrol olarak yer almıştır. TDZ dozlarında ve kontrollerde sürgün gelişimi ZEA içeren ortamlardan daha yüksek olmuş, ZEA sürgünlerde anormal gelişimlere yol açmış, kültürde alt kültüre alınabilecek nitelikte uzun sürgünler gelişmemiştir. MS besin ortamı WPM besin ortamına göre sürgün verimini artırmış, ancak köklenme aşamasında WPM ortamı MS'e göre köklenme oranı ve kök sayısı bakımından daha üstün olmuştur. Köklenme ortamlarına 1 veya 2 mg/l IBA eklenmiş, dozlar arasında köklenme bakımından fark oluşmamıştır.

Fidancı (2015), Marmara bölgesi kocayemiş seleksiyonuna ait 4 tip kocayemişte doku kültürü ile üretim yapmıştır. Çalışmada sürgün ucu, lateral gözler ve üzerinde bir göz bulunan nodlar kullanılmış; sürgün ucu kültüründe kararmalar meydana gelirken, lateral gözlerde kararma ve cılız büyüme görülmüştür. En iyi gelişme, üzerinde bir göz bulunan nodlardan elde edilmiştir. ½ MS + MS vitaminler ve MS + MS vitaminler ortamında farklı sitokinin dozları denenmiş, zeatin dozlarının kardeşlenmeye ve sürgün uzunluğuna etkili olduğu saptanmıştır. Köklendirme çalışmalarında in vitro köklenme *in vivo* köklenmeye göre daha iyi sonuç vermiş, en yüksek köklenme değeri (%86,7) 5 mg/l IBA dozunda gerçekleşmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması, 2016-2018 yıllarında, Kocaeli Üniversitesi Arslanbey Meslek Yüksekokulu Yerleşkesi Bitki Doku Kültürü ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

2.1 Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Sulusoglu ve diğerleri (2011) tarafından gerçekleştirilen seleksiyon çalışmasında yer alan Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ereğli ve Ulaşlı 1 kocayemiş genotipleri kullanılmıştır. Yuvacık 2, Yuvacık 3 ve Yuvacık 4 genotipleri Kocaeli ili Başiskele ilçesi Yuvacık beldesi, Ulaşlı 1 genotipi Gölcük ilçesi Ulaşlı beldesi, Ereğli genotipi ise Karamürsel ilçesi Ereğli beldesi sınırlarında yer almaktadır. Çalışmada yer alan kocayemiş genotipleri lokasyon haritası şekil 2.1'de ve kocayemiş genotiplerinin genel görünümleri ise şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Çalışmada yer alan kocayemiş genotipleri lokasyon haritası



Yuvacık 2



Yuvacık 3



Yuvacık 4



Ulaşlı 1



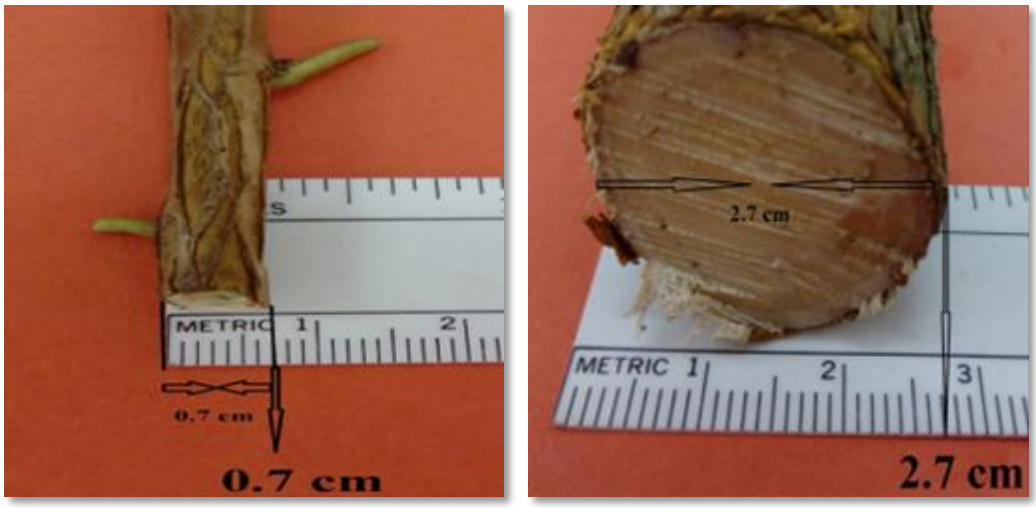
Ereğli

Şekil 2.2. Çalışmada yer alan kocayemiş genotiplerinin genel görünümü

Çalışmada kültürlerin dikiminde kullanılacak materyalin temin edilmesi amacı ile doğadaki bitkilerden alınan 0,5-3,5 cm çapında ve 20-40 cm uzunluğundaki odun dalları (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) içinde musluk suyu bulunan plastik kovalara yerleştirilerek, doku kültürü laboratuvarında, tezgahların altında özel olarak oluşturulmuş 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık zaman ayarlı flouresan lamba altında, oda koşullarında (15-25ºC sıcaklıkta) epikormik sürgün oluşumu için bekletilmişlerdir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). Haftada bir defa olmak üzere kovalarda bulunan su miktarları kontrol edilerek gerekli su ilavesi yapılmıştır.



Şekil 2.3. Doğadaki kocayemiş genotiplerinden alınan odun dalları



Şekil 2.4. Kocayemişlerden alınan odun dallarının çapları



Şekil 2.5. Laboratuvar koşullarında odun dallarından epikormik sürgün gelişimi



Şekil 2.6. Odun dallarından gelişen epikormik sürgünler

Ortalama olarak 8-10 cm uzunluğa ulaşan sürgünlerden alınan sürgün ucu eksplantları ve boğumlu (nodlu) eksplantlar dikim materyali olarak değerlendirilmişlerdir. Laboratuvar şartlarında uzamış ve dikim aşamasına gelmiş olan epikormik sürgünlere ait fotoğraflar şekil 2.7 ve şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Dikim aşamasına ulaşan epikormik sürgünler



(a) (b)

Şekil 2.8. Eksplant tipleri, a) sürgün ucu, b) boğumlu (nod) bölüm

2.2. Yöntem

2.2.1. Uygun sterilizasyon tekniğinin belirlenmesi

Sterilizasyon çalışmaları, doku kültürü çalışmalarında başarıyı etkileyen çok önemli faktördür. Doğal şartlarda her türlü hastalık ve zararlı etmenleri ile birlikte yaşayan, diğer bir ifade ile biyotik etmenlere maruz kalan kocayemiş genotiplerinin sürgün ucu ve boğum eksplantları kullanılarak gerçekleştirilen doku kültürü çalışmalarında uygun sterilizasyon işleminin yapılarak in vitro kültürlerde başarı oranının artırılması tezdeki ilk çalışmaları oluşturmuştur. Sterilizasyon çalışmaları Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ereğli ve Ulaşlı 1 genotiplerinde yürütülmüştür. Bitkisel materyalin

sterilizasyonu için etil alkol ve/veya sodyum hipokloritin (NaClO) farklı kombinasyonlarından faydalanılmış, kullanılan dozlar ile uygulama süreleri tablo 2.1'de verilmiştir. Sterilizasyon sırasında sterilizasyon sıvısına 2-3 damla tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$) ilave edilerek sterilizasyonun etkinliği artırılmıştır.

Tablo 2.1. Sterilizasyon uygulamaları ve süreleri

	Sterilizasyon Tekniği
A	%70 Etil Alkol (1 dakika) + %20 Sodyum Hipoklorit (15 dakika)
B	%70 Etil Alkol (2 dakika) + %20 Sodyum Hipoklorit (12 dakika)
C	%50 Etil Alkol (1 dakika) + %20 Sodyum Hipoklorit (10 dakika)
D	%50 Etil Alkol (1 dakika) + %20 Sodyum Hipoklorit (12 dakika)
E	%20 Sodyum Hipoklorit (10 dakika)

Kocayemiş genotiplerinden laboratuvar koşullarında süren epikormik sürgünler alınarak, akan musluk suyu altında 20 dakika boyunca bekletilmiş, sürgünlerin yüzeysel kontaminasyonu azaltılmaya çalışılmıştır. Ardından sürgün ucu ve boğum eksplantları hazırlanarak, tablo 2.1'de ayrıntısı verilmiş olan sterilizasyon yöntemlerine göre, %0, %50 veya %70' lik etil alkol dozlarından biri ile 1 veya 2 dakikalık sterilizasyonu takiben, 3'er defa steril saf su ile 1 dakika durulanmıştır. Durulamanın ardından, eksplantlar 2-3 damla tween 20 ilave edilen % 20'lik sodyum hipoklorit ile 10, 12 veya 15 dakika süresince çalkalanarak dezenfekte edilmiştir. Bu işlem sonrası 3'er defa steril saf su ile 5 dakika çalkalanan eksplantlar, dikim için hazır hale getirilmiştir. Sterilizasyon işlemleri laminer hava akışlı kabin içinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. İlk dikim aşamasında bitkisel materyalin sterilizasyonu

Kocayemiş genotiplerinden alınan epikormik sürgünler, 20 dakika süre ile akan çeşme suyu altında bekletilerek yüzey temizliği gerçekleştirildikten sonra, sürgün ucu ve boğum eksplantları hazırlanmış, laminer hava akışlı kabin içine alınarak 1 dakika süreyle %50'lik etil alkol ile sterilizasyona tabi tutulmuştur. Etil alkolden çıkarılan eksplantlar 3 defa steril saf su ile 1'er dakika durulanarak etil alkol uzaklaştırılmıştır. Bu işlemi takiben eksplantlar; içerisine 2-3 damla tween 20 eklenen %20'lik sodyum hipoklorit ile 12 dakika çalkalanarak steril edilmiştir. Bu işlemin sonrasında eksplantlar 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulanmış ve dikime hazır duruma getirilmiştir.

2.2.3. Sürgün gelişimi ve köklenme aşamasında kullanılan besin ortamlarının hazırlanması

Denemelerde tam kuvvetinde MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tablo 2.2) ve tam kuvvetinde Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1981) (Tablo 2.3) besin ortamı olmak üzere iki farklı besin ortamı kullanılmıştır (Şekil 2.9). 2016 yılında gerçekleştirilen ilk yıl denemelerinde sterilizasyon denemeleri, ilk dikim, alt kültür ve ilk çoğaltma aşamasında ve ilk köklendirme çalışmasında MS temel besin ortamı kullanılmış, ancak bitki gelişmesinin istenilen değerlerde seyretmemesi ve olumsuzluklar nedeni ile çalışmalara WPM besin ortamı ile devam edilmiştir. Ortam hazırlığında 100 kuvvetinde hazırlanmış stok besin çözeltileri kullanılmıştır. Stoklar buzdolabında +4 ºC sıcaklıkta saklanmıştır.



(a) (b)

Şekil 2.9. Besin ortamı stokları, a) MS, b) WPM

Tablo 2.2. MS besin ortamı içeriği (Murashige & Skoog, 1962)

İçerik (A) MAKRO ELEMENTLER	Konsantrasyon (mg/l)
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	1650
Potasyum nitrat (KNO_3)	1900
Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2$ 2 H_2O)	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2 PO_4)	170
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4$ 7 H_2O)	370
(B) DEMİR	
Sodyum – demir EDTA ($C_{10}H_{12}N_2FeNa$)	36,7
(C) MİKRO ELEMENTLER	
Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4$ H_2O)	16
Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4$ 7 H_2O)	8,6
Borik asit (H_3BO_3)	6,2
Potasyum iyodur (KI)	0,83
Sodyum molibdat dihidrat (Na_2MoO_4 $2H_2O$)	0,25
Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4$ 5 H_2O)	0,025
Kobalt klorür heksahidrat ($CoCl_2$ 6 H_2O)	0,025
(D) VİTAMİNLER	
Myo – inositol ($C_6H_{12}O_6$)	100
Thiamin klorid hidroklorid ($C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ x H_2O)	0,1
Nikotinik asit ($C_6H_5NO_2$)	0,5
Pridoksil hidroklorid ($C_8H_{12}ClNO_3$)	0,5
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	2

Tablo 2.3. Woody Plant Medium besin ortamı içeriği (McCown & Lloyd, 1981)

İçerik	Konsantrasyon (mg/l)
(A) MAKRO ELEMENTLER	
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	400
Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2$ 2 H_2O)	96
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4$ 7 H_2O)	370
Potasyum sülfat (K_2SO_4)	990
Kalsiyum nitrat tetrahidrat $Ca(NO_3)_2$ 4 H_2O	556
(B) DEMİR	
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4$) 7 H_2O	27,8
(C) MİKRO ELEMENTLER	
Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4$ H_2O)	22,3
Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4$ 7 H_2O)	8,6
Borik asit (H_3BO_3)	6,2
Sodyum molibdat dihidrat (Na_2MoO_4 2 H_2O)	0,25
Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4$ 5 H_2O)	0,25
Sodyum – EDTA dihidrat (Na_2 EDTA 2 H_2O)	37,3
(D) VİTAMİNLER	
Myo – inositol ($C_6H_{12}O_6$)	100
Thiamin klorid hidroklorid ($C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ x H_2O)	0,1
Nikotinik asit ($C_6H_5NO_2$)	0,5
Pridoksil hidroklorid ($C_8H_{12}ClNO_3$)	0,5
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	2

2.2.4. İlk dikim aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları

Araştırmanın birinci yılı olan 2016 yılında Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ulaşlı 1 ve Ereğli olmak üzere 5 adet kocayemiş genotipinin sürgün ucu ve boğumları ile ilk dikimler gerçekleştirilmiştir. İlk dikimler hormonsuz MS besin ortamına, 160 x 15 mm boyutlarındaki cam deney tüplerine yapılmıştır. Besin ortamının pH'sı 1 M NaOH (Sodyum Hidroksit) ve 1 M HCl (Hidroklorik Asit) kullanılarak 5,6 olarak ayarlanmıştır (Papafotiou ve diğ., 2013). Besin ortamının ısıtılmasında elektirikli analog balon ısıtıcı kullanılmıştır. Ortam sıcaklık derecesi 50º C' ye ulaştığında, ortama 30 g/l sakkaroz (Merck) ve 7 g/l agar (Merck) ilave edilerek karıştırılmış, ortam kaynamaya başlayıp berraklaşma görülünce ortam ısıtıcıdan cam tüplere borucam otomatik pipet başlığı vasıtasıyla dağıtılmıştır. Her tüpte 10 ml besin ortamı olacak şekilde eşit olarak dağıtılma işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin ağız kısmı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Tüpler 121º C sıcaklıkta 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

2.2.5. Alt kültür aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları

İlk kültür aşamasında canlı kalan eksplantların daha iyi sürgün gelişiminin sağlanabileceği 250 ml'lik erlenlere şaşırtılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Besin ortamı olarak 0,5-1-2 ve 4 mg/l BAP dozlarından birini içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Kontrol olarak hormonsuz MS besin ortamı yer almıştır. Tüm ortamlara 0,1 mg/l GA_3 ilave edilmiştir. Ortam pH'sı 5,6 olarak ayarlandıktan sonra 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ilave edilerek 20 dakika süre ile sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Alt kültürlerde Ereğli, Ulaşlı 1, Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotipleri yer almıştır. Yuvacık 3 genotipinde sürekli olarak içsel enfeksiyon gelişmiş ve sağlıklı sürgün canlılığı sağlanamadığı için alt kültüre alınamamıştır.

2.2.6. Çoğaltma aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları

Alt kültürlerde gelişen sürgünler çoğaltma aşamasında 1-2-4 ve 6 mg/l BAP dozlarından biri ile 0,5 mg/l IBA ve 0,25 mg/l GA_3 içeren MS ortamında iki defa

çoğaltma amaçlı dikilmiş, sonuçlar iki kültürün ortalaması olarak verilmiştir. Alt kültür aşamasında sürgün boylanmasının yetersiz olması nedeniyle, çoğaltma ortamında GA_3 dozu 0,1 mg/l'den 0,25 mg/l'ye çıkartılmış ve 0,5 mg/l IBA ilave edilmiştir. Eldeki materyal sayısının kısıtlı olması nedeniyle 0,5 mg/l BAP dozunda yeterli gelişim sağlanamadığı için çoğaltma aşamasında kullanılmamıştır.

İlk iki sürgün çoğaltma aşamasında istenilen seviyede sürgün verimi ve sürgün uzaması elde edilemediğinden, literatür taramaları ve değerlendirmeler neticesinde temel besin ortamının değiştirilmesine karar verilerek, sonraki sürgün çoğaltma çalışmalarında WPM temel besin ortamı ile devam edilmiştir. WPM temel besin ortamına 1, 2 ve 4 mg/l BAP dozları ile birlikte 0,1 mg/l GA_3 ilave edilmiştir. GA_3 dozu sürgün boğum aralarında oluşan cılızlaşma nedeniyle bu aşamada 0,25 mg/l' den yeniden 0,1 mg/l'ye indirilmiştir. Ereğli genotipinde yeterli sürgün materyali olmadığından çoğaltma aşamasında Ulaşlı 1, Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotipleri yer almıştır. Farklı kültür aşamalarında yer alan kocayemiş genotipleri ve besin ortamları içerikleri bilgileri tablo 2.4'tedir.

Tablo 2.4. İlk dikim, alt kültür ve sürgün çoğaltma aşamalarında ortamların içerikleri

Genotipler	Aşamalar	Besin Ortamları
Yuvacık 2 Yuvacık 3 Yuvacık 4 Ereğli Ulaşlı 1	İlk Dikim	Hormonsuz MS
Yuvacık 2 Yuvacık 4 Ereğli Ulaşlı 1	Alt Kültür	MS + 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		MS + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		MS + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		MS + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
Yuvacık 2 Yuvacık4 Ulaşlı 1	MS Ortamında Sürgün Çoğaltımı	MS + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3
		MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3
		MS + 4 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3
		MS + 6 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3
Yuvacık 2 Yuvacık4 Ulaşlı 1	WPM Ortamında Sürgün Çoğaltımı	WPM + 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		WPM + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		WPM + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3
		WPM + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3

2.2.7. Köklendirme aşamasında kullanılan besin ortamlarının içeriği ve kültür kapları

İlk köklendirme denemesinde, MS besin ortamında çoğaltılan kocayemiş genotiplerinden yalnız Yuvacık 2 genotipinde köklendirmeye alınabilecek nitelikte sürgün miktarı elde edilebilmiş, sürgünler tam kuvvetinde MS besin ortamında 0,5-1 veya 2 mg/l IBA dozlarından birini içeren ortamlarda köklenmeye alınmıştır. Ortamlara sürgün gelişimini artırıcı etki yapabileceği değerlendirilerek 0,1 mg/l GA_3 ve 0,25 mg/l BAP ilave edilmiştir (Tablo 2.5).

WPM temel besin ortamında çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi yine tam kuvvetindeki WPM temel besin ortamında yapılmıştır. İlk köklendirme denemesinde kök oluşmaması, aksine kallus gelişiminin olması nedeniyle WPM ortamındaki köklendirme çalışmalarında GA_3 ve BAP kullanılmamış, IBA (1-2-4 mg/l) veya NAA (1-2-4 mg/l) dozlarının köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır. Köklenme için en uygun büyüme düzenleyici ve dozunun bulunması için çalışmalar gerçekleştirilmiş ve değerlendirilmeler yapılmıştır. İkinci köklendirme çalışmalarında aynı lokasyon içinde bulunan Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 isimli genotiplerin eksplantları kullanılmıştır.

2.2.8. Dış koşullara alıştırma (Adaptasyon) çalışmaları

Köklendirme denemesinden elde edilen mikro bitkiler, ilk olarak 121 ºC'de 2 saat sürede otoklavlanmış perlit içeren şeffaf plastik bardaklara dikilmişlerdir. Dikim yapmadan önce, bulundukları agarlı ortamdan alınan bitkilerin kökleri, aktif maddesi %9 dimethomorph + %60 mancozeb olan bitki koruma ürünü içeren steril saf su ile yıkanmıştır. Kökleri agardan temizlendikten sonra mikro bitkilerin dikimi gerçekleştirilmiş, steril saf su ile sulanması yapılmış, yapraklarına yine steril saf su püskürtme şeklinde tatbik edilmiştir. Bitkilerin nem kaybını önlemek amacıyla üzerlerine küçük plastik torbalar geçirilmiş, torbayı sabitlemek için bardak etrafına lastik takılmıştır. Dikimden 3 gün sonra plastik torbalara 2-3 adet delik açılmış, adaptasyon durumuna göre delik sayıları ve büyüklükleri arttırılmıştır. Bu işlemden 20 gün sonra plastik torbalar tamamen kaldırılmıştır. Üstleri açıldıktan sonra 2 haftalık zaman zarfında bitkilerin yapraklarına günde 3 defa musluk suyu

püskürtülmüştür. Bitkiler iki aylık zaman periyodu sonunda, içeriği torf:perlit (1:1 v/v) olan plastik bardaklara aktarılmıştır.

Tablo 2.5. Köklendirme aşamasında ortamların içerikleri

Genotipler	Aşamalar	Besin Ortamları
Yuvacık 2	MS besin ortamında köklendirme	MS + 0 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 GA_3
		MS + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 GA_3
		MS + 1 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 GA_3
		MS + 2 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 GA_3
Yuvacık 2 Yuvacık 4	WPM besin ortamında köklendirme	WPM + 1 mg/l IBA
		WPM + 2 mg/l IBA
		WPM + 4 mg/l IBA
		WPM + 1 mg/l NAA
		WPM + 2 mg/l NAA
		WPM + 4 mg/l NAA

2.2.9. İncelenen özellikler ve değerlendirmede izlenen yöntemler

2.2.9.1. Sterilizasyon denemesi

Farklı sterilizasyon tekniği uygulanarak kültüre alınan eksplantlar (sürgün ucu ve nod kültürü), dikimden 10 gün sonra incelenmiş, yaşama oranları (%), kararma oranları (%) ve enfeksiyon oranları (%) belirlenmiştir.

2.2.9.2. İlk dikim kültürleri

Sürgün ucu ve boğumlu (nodlu) eksplantlar ilk dikim aşamasında ayrı ayrı temel besin ortamına dikilmiş, dikimi yapılan eksplantların gözlemleri ise 15 gün sonunda yapılmıştır. Proliferasyon gösteren ve göstermeyen eksplantlar ayrılmaksızın alt kültüre alınmıştır.

2.2.9.3. Alt kültürler

Alt kültür aşamasında kültür süreleri 30 gün olarak gerçekleştirilmiş, yeni oluşan sürgünler ayrılarak çoğaltma ortamlarına dikilmiştir.

2.2.9.4. Sürgün çoğaltma kültürleri

Çoğaltma ortamında da kültür süreleri 30 gün olmuş, sağlıklı gelişen sürgünler köklenme ortamlarına alınmıştır.

2.2.9.5. Köklendirme çalışmaları

İlk köklendirme çalışmaları 0,5-1-2 mg/l IBA dozlarından biri ile birlikte 0,25 mg/l BA ve 0,1 mg/l GA_3 içeren MS besin ortamında yapılmıştır. Çalışmada köklenme ortamına alınabilecek nitelikte sürgün elde edilebilen tek genotip Yuvacık 2 genotipi yer almıştır.

İkinci köklendirme denemesinde olumsuz etkileri nedeniyle MS besin ortamı yerine WPM besin ortamı kullanılmıştır.

2.2.9.6. Dış koşullara alıştırma (Adaptasyon) çalışmaları

Mikro bitkilerin yaşama oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir. Her uygulamadan farklı sayıda bitkicik dış koşullara alındığı için istatistik analiz yapılamamıştır.

2.2.10. Araştırmada yapılan ölçümler

2.2.10.1. Yaşama oranı (%)

Kültürler sırasında görülen kararma ve enfeksiyon sonucu ölen ve canlı kalan eksplantların oranları belirlenmiş ve yaşama oranları yüzde (%) olarak verilmiştir.

2.2.10.2. Enfeksiyon oranı (%)

Kültürler sırasında oluşan enfeksiyon oranı yüzde (%) olarak verilmiştir.

2.2.10.3. Kararma oranı (%)

Kültürler sırasında ortamda ve sürgünde kararma olan eksplantlar belirlenerek, yüzde (%) olarak verilmiştir.

2.2.10.4. Yeni sürgün oluşturan eksplant oranı (%)

Proliferasyon gösteren eksplantların oranları canlı kalan eksplant sayısı esas alınarak yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

2.2.10.5. Sürgün verimi (adet)

İlk dikim, alt kültürler, çoğaltma ve köklendirme denemelerinde, her bir eksplanttan yeni oluşan sürgünlerin ortalama sayıları adet olarak belirlenmiştir.

2.2.10.6. Sürgün uzunluğu (cm)

İlk dikim, alt kültürler ve çoğaltma ortamlarında elde edilen yeni sürgünlerin boyları ölçülmüş, sürgün sayısına bölünerek ortalama sürgün uzunluğu cm olarak belirlenmiştir.

2.2.10.7. Uzayan ana eksplant oranı (%)

Kültür ortamına dikilen eksplantlardan her deneme aşamasında uzayanların sayıları belirlenmiş, canlı kalan eksplant sayısı üzerinden yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

2.2.10.8. Ana eksplantlarda uzama miktarı (cm)

Ana eksplantların ilk dikim anındaki boyları 0,5 cm civarındadır. 30 günlük kültür periyodu sonunda boyları ölçülerek ortalama olarak verilmiştir. Boy uzunlukları cm olarak belirlenmiştir.

2.2.10.9. Yapraklarda irileşme (%)

Kültürler sırasında eksplant yapraklarında oluşan irileşme ve anormal gelişim gösterenlerin oranı canlı eksplant sayısına göre hesaplanarak yüzde (%) olarak verilmiştir.

2.2.10.10. Köklenme oranı (%)

Köklendirme ortamlarına dikilen 0,8-1 cm uzunluğundaki sürgünlerden 40 gün sonra köklenen sürgünler sayılarak oranları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda canlı sürgünler esas alınmıştır.

2.2.10.11. Kök sayısı (adet / eksplant)

Köklenen her sürgündeki kökler sayılmış adet olarak ortalama kök sayısı bulunmuştur.

2.2.10.12. Kök uzunluğu (cm)

Genotiplerdeki köklenen her sürgündeki köklerin uzunluğu belirlenmiş, elde edilen verilerden ortalama kök uzunluğu değeri cm olarak hesaplanmıştır.

2.2.10.13. Köklendirme ortamında kallus oluşumu (%) ve çapları (cm)

Köklenme ortamına dikilen mikro sürgünlerin kallus oluşum oranları yüzde (%) olarak belirlenmiştir. Daha sonra kallus büyüklükleri cm cinsinden ölçülmüştür.

2.2.10.14. Köklendirme aşamasında oluşan sürgünlerin değerlendirilmesi

Köklenme ortamlarının içine, kullanılan genotiplerden uzunlukları 0,8-1 cm olan sürgünler alınmıştır. Köklenme süresi sonunda sürgünlerin uzunlukları cm olarak ölçülerek değerlendirilme yapılmıştır.

2.2.10.15. Dış koşullara alıştırmada yaşama oranı (%)

Köklendirme ortamında köklenen ve dış koşullara alınan bitkilerden 40 gün sonra canlı kalanların oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

2.2.11. Kültür Koşulları

Tüm denemeler, sıcaklığı 25±1 ºC, aydınlatma süresi 16 saat aydınlık ve ışık şiddeti 2200 lüks olan iklim dolabında yürütülmüştür.

2.2.12. Verilerin değerlendirilmesi

İlk dikim, alt kültür, sürgün çoğaltma ve köklenme denemeleri, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Her bir deneme 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. İlk dikimde her bir tekerrür için 5 eksplant, alt kültür ve çoğaltma aşamalarında ise her bir tekerrürde 3 eksplant yer almıştır.

İstatiksel değerlendirmelerde Minitab istatistik paket programı kullanılmıştır. F testine (Varyans Analizine) göre kontroller gerçekleştirilmiş, tespit edilen önemli farklılıklar ANOVA' nın çok yönlü testlerinde Tukey testi ile ($P \leq 0,05$) hata sınırı baz alınarak yapılmıştır. İstatiksel analizlerde yüzde (%) bulgularda açı transformasyonu kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Odun dallarından epikormik sürgün çıkışının başlaması, sürgünün kendini gösterecek büyüklüğe gelmesi Yuvacık 3 genotipi dışındaki genotiplerde ortalama olarak 30 gün sürmüş, sürgünler 45 gün sonra dikilebilecek duruma gelmiştir. Denemede yer alan kocayemişler içinde en geç epikormik sürgün başlangıcı Yuvacık 3 genotipinde ortalama 45 gün civarında oluşmuştur. Bu genotipin dikime hazır duruma gelmesi ise ortalama 60-70 gün civarında gerçekleşmiştir.

3.1 Sterilizasyon Çalışmalarının Sonuçları

Sürgün ucu ve boğum (nod) eksplantları kültüre alındıktan 3 hafta sonra değerlendirilmiş ve eksplantlarda yaşama oranı, enfeksiyon oranı ve kararma oranı belirlenmiştir. Eksplant tipi x sterilizasyon tekniği interaksiyonu incelenen üç özellik bakımından istatistiksel olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Sürgün ucu ve boğumlu eksplantların her ikisinde en yüksek yaşama oranı (sırasıyla %85,06 ve %84,41) D sterilizasyon uygulamasına tabi tutulan (%50 etil alkol ile 1 dakika + sodyum hipoklorit ile 12 dakika) eksplantlarda sağlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Eksplant tipi ve sterilizasyon tekniğinin yaşama oranı (%) üzerine etkileri

Materyal tipi	Sterilizasyon Tekniği					
	A	B	C	D	E	Ortalama
Sürgün ucu	44,81de*	64,65bc	55,28cd	85,06a	58,12cd	61,58
Boğum (nod)	30,56ef	77,38ab	65,51bc	84,41a	26,50f	56,87

* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatiksel olarak % 5 seviyesinde önemlidir.

D sterilizasyon tekniği olarak adlandırılan %50 etil alkol ile 1 dakika + %20 sodyum hipoklorit ile 12 dakika sterilizasyon tekniği, enfeksiyon oluşumunun önlenmesi ve kültürler sırasında içsel olarak gelişen enzimatik kararmanın azalması konusunda da çok başarılı olmuştur (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Eksplantlarda görülen kararma durumu

şekil 3.3'te, ortamlarda oluşan enfeksiyonların genel görünümü şekil 3.4'te ve sağlıklı gelişen sürgün ucu ve boğumlu eksplantların genel görünümü şekil 3.5'te gösterilmiştir. Sürgün uçları ve boğumlu eksplantların kültür ortamlarında görülen enfeksiyon oranı D sterilizasyon tekniğinde sırasıyla %7,14 ve %7,52 gibi çok düşük oranlarda kalmış, eksplant tipi arasında istatistiksel olarak fark oluşmamıştır (Tablo 3.2). Kararma bakımından da iki materyal tipi arasında istatistiksel fark ortaya çıkmamış, D sterilizasyon tekniği ile sterilizasyona tabi tutulan eksplantlarda en az kararma oluşmuştur (Tablo 3.3).

Tablo 3.2. Eksplant tipinin ve sterilizasyon tekniğinin enfeksiyon oranı (%) üzerine etkileri

Eksplant tipi	Sterilizasyon Tekniği					
	A	B	C	D	E	Ortalama
Sürgün ucu	8,52d*	23,74bc	13,37cd	7,14d	29,96ab	16,55
Boğum (Nod)	31,02ab	8,9d	12,24cd	7,52d	39,6a	19,86

* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatiksel olarak % 5 seviyesinde önemlidir.

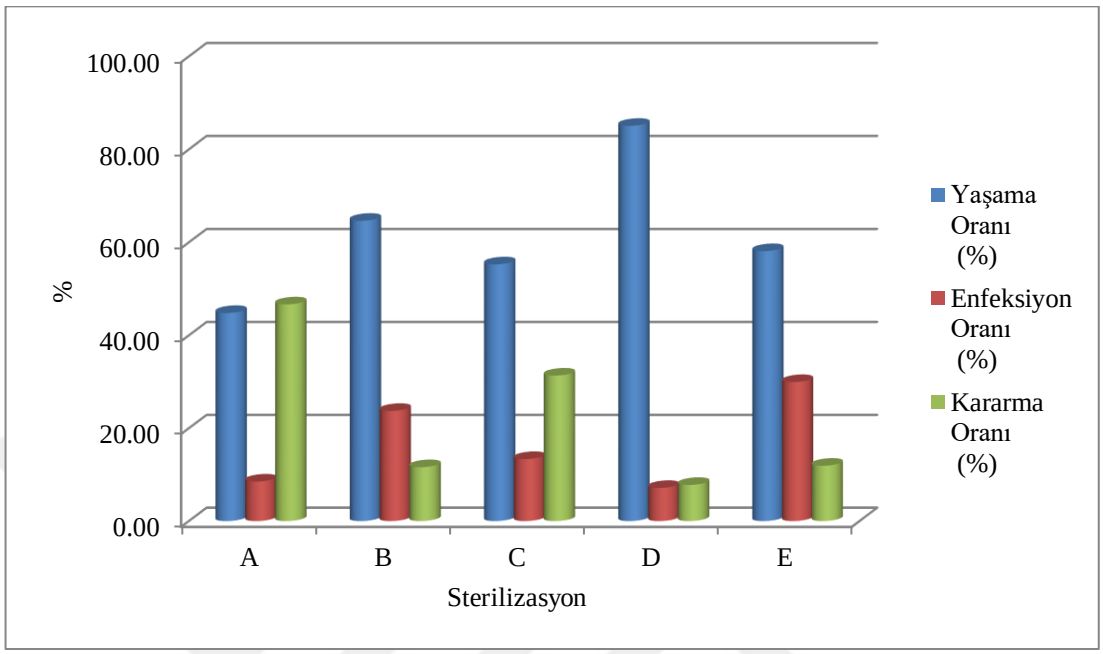
Tablo 3.3. Sterilizasyon çalışmalarında kararma oranları (%)

Eksplant tipi	Sterilizasyon Tekniği					
	A	B	C	D	E	Ortalama
Sürgün ucu	46,67a*	11,62de	31,35bc	7,79e	11,92de	20,31
Boğum (Nod)	38,43ab	13,69de	22,25cd	8,07e	33,91abc	23,32

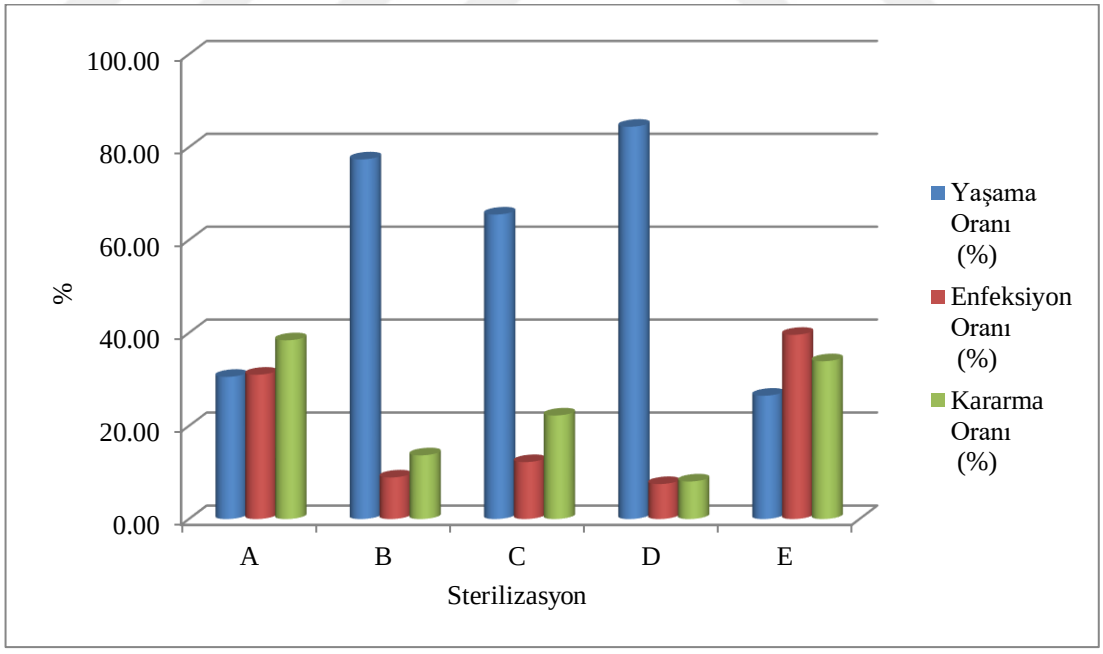
* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatiksel olarak % 5 seviyesinde önemlidir.

Sterilizasyon çalışmaları sonucunda; hem boğumlu eksplantlarda hem de sürgün ucu eksplantlarda en ideal sonucu veren ve en yüksek yaşama oranına ulaşılmış olan

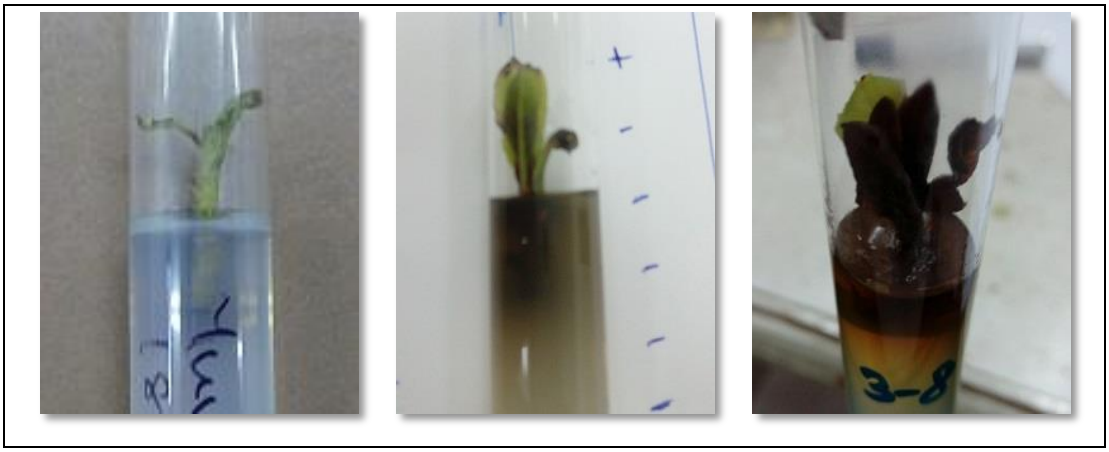
D sterilizasyon tekniği (%50 etil alkol ile 1 dakika muamele + %20 sodyum hipoklorit ile 12 dakika muamele) ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.



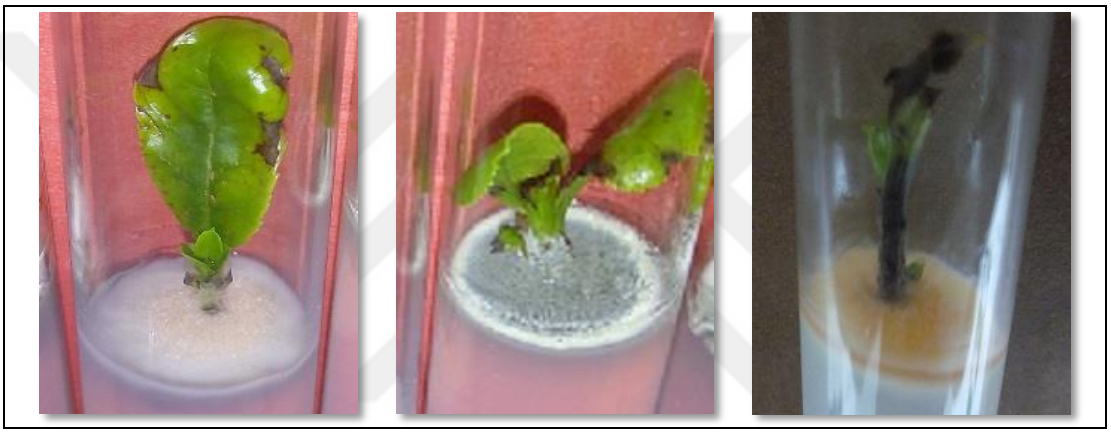
Şekil 3.1. Sürgün ucu eksplantlarında farklı sterilizasyon tekniğinde; yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)



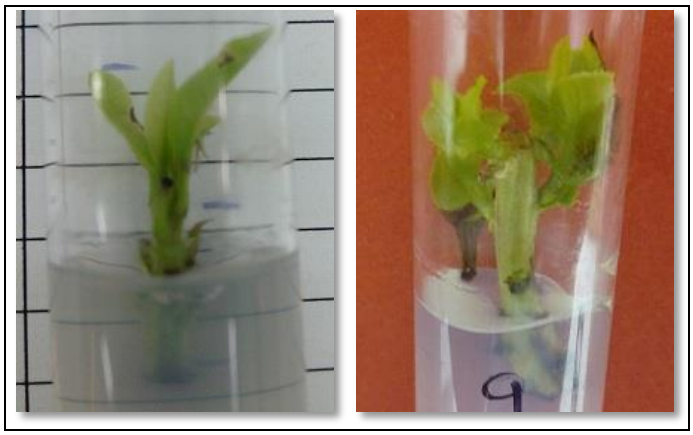
Şekil 3.2. Boğumlu eksplantlarda farklı sterlizasyon tekniğinde; yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)



Şekil 3.3. Eksplantlarda görülen kararma durumları



Şekil 3.4. Ortamlarda oluşan enfeksiyonların genel görünümü



Şekil 3.5. Sağlıklı gelişen eksplantlar

3.2. Kocayemiş Genotiplerinde İlk Dikim Sonuçları

İlk dikimde Yuvacık 2, Yuvacık 3, Yuvacık 4, Ulaşlı 1 ve Ereğli kocayemiş genotipleri yer almıştır. Eksplant tipleri, boğumlu eksplant (nodlu eksplant) ve sürgün ucu olarak ayrılmış, eksplant tipinin gelişim üzerine etkileri incelenmiştir.

İlk dikim aşamasında denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş, her tekerrürde 5 adet sürgün ucu veya boğum (nod) yer almıştır. Genotiplerin istatistik analizleri ayrı ayrı yapılmıştır.

Kocayemiş genotiplerinden alınan odunsu materyallerden süren epikormik sürgünlerin uç noktalarından alınan 0,5-1 cm uzunluğundaki eksplantlardan oluşmuş olan sürgün uçları ve epikormik sürgünlerden alınan 1 cm uzunluğundaki boğumlu eksplantlar ilk dikimlerde kullanılmıştır. İlk dikimlerde Yuvacık 2, Yuvacık 3 ve Yuvacık 4 ile Ulaşlı 1 ve Ereğli genotipleri olmak üzere 5 adet kocayemiş genotipinin tam kuvvetinde hormonsuz MS temel besin ortamına dikimleri yapılmış, dikimlerden 15 gün sonra sürgünlerde yaşama, enfeksiyon, kararma ve proliferasyon oranı, yeni sürgün adedi ve yeni sürgün boyu belirlenmiştir. Ayrıca uzama yapan ana eksplant oranı ile ana eksplantlardaki uzama miktarı belirlenmiştir.

3.2.1. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim sonuçları

Yuvacık 2 genotipinde ilk dikimlerde incelenen bütün parametreler bakımından sürgün ucu ve boğum eksplantları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Kültürlerde yaşama oranı oldukça yüksek olmuş (sırasıyla sürgün ucu eksplantlarında %93,33 ve boğum eksplantlarında %86,67), kültürlerde enfeksiyon görülmemiş, kararma oranı ise çok düşük olmuştur (Tablo 3.4).

İlk dikim aşamasında Yuvacık 2 genotipinde sadece boğumlu eksplantlarda proliferasyon elde edilmiş (%35,00), ortalama uzunluğu 0,33 cm olan 1,67 adet yeni sürgün gelişimi oluşmuştur. Dikilen ana eksplantların hepsinde ilk dikimden sonra ortalama 0,87 cm'lik bir uzama olmuştur (Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)

Yuvacık 2	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)
Sürgün ucu	93,33	0,00	6,67
Boğumlu eksplant	86,67	0,00	13,33
Ortalama	90,00	0,00	10,00

Tablo 3.5. Yuvacık 2 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı (%), sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi

Yuvacık 2	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Uzama oluşturan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant uzaması (cm)
Sürgün ucu	0,00	0,00	0,00	100	0,80
Boğumlu eksplant	35,00	1,67	0,33	100	0,94
Ortalama	17,50	0,84	0,17	100	0,87

3.2.2. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim sonuçları

Yuvacık 3 genotipi çalışmada içsel enfeksiyon ve kontaminasyon nedeni ile en çok sorun yaşanan genotip olarak kendini göstermiştir. Yuvacık 3 genotipinde boğumlu eksplantlarda daha yüksek canlılık olmuş, ancak sürgün ucu eksplantlarına göre fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Her iki grup eksplantta da eşit oranda kararma görülürken, sürgün uçlarında enfeksiyona bağlı ölüm oranı artmıştır. Her iki özellik açısından istatistiksel farklılık oluşmamıştır (Tablo 3.6).

Boğumlu eksplantlarda %8,33 gibi çok düşük oranda proliferasyon oluşmuş ve sürgün verimi 0,33 olmuştur. Ana eksplantların her birinde uzama (1,80 cm/eksplant) olmuştur. İncelenen tüm parametreler bakımından istatistiksel fark belirlenmemiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.6. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)

Yuvacık 3	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma Oranı (%)
Sürgün ucu	33,33	33,40	33,33
Boğumlu eksplant	40,00	26,67	33,33
Ortalama	36,67	30,00	33,33

Tablo 3.7. Yuvacık 3 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı (%), sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi

Yuvacık 3	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Uzama oluşturan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant uzaması (cm)
Sürgün ucu	0,00	0,00	0,00	100	2,06
Boğumlu eksplant	8,33	0,33	0,17	100	1,54
Ortalama	4,17	0,17	0,09	100	1,80

3.2.3. Yuvacık 4 genotipinde ilk dikim sonuçları

Yuvacık 4 genotipinde incelenen özellikler istatistiksel fark oluşturmamıştır. Yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları sürgün ucu ve boğumlu eksplantlarda eşit olarak gözlenmiştir (Tablo 3.8). Boğumlu eksplantlarda %27,78 oranında proliferasyon olmuş, ortalama 1 adet yeni sürgün oluşmuştur. Yine tüm ana eksplantlarda uzama olmuş, ortalama sürgün boyu 0,90 cm'ye ulaşmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.8. Yuvacık 4 genotipinde genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)

Yuvacık 4	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)
Sürgün ucu	73,33	0,00	26,66
Boğumlu eksplant	73,33	0,00	26,66
Ortalama	73,33	0,00	26,66

Tablo 3.9. Yuvacık 4 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı (%), sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi

Yuvacık 4	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Uzama oluşturan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant uzaması (cm)
Sürgün Ucu	0,00	0,00	0,00	100	0,94
Boğumlu eksplant	27,78	1,00	0,43	100	0,86
Ortalama	13,89	0,50	0,22	100	0,90

3.2.4. Ulaşlı 1 genotipinde ilk dikim sonuçları

Ulaşlı 1 genotipinde yaşama, enfeksiyon oluşumu ve kararma bakımından istatistiksel fark bulunmamıştır (Tablo 3.10).

Ulaşlı 1 genotipinde sürgün ucu eksplantlarında proliferasyon oluşmazken, boğum eksplantlarında %75,00 oranında yeni sürgün gelişimi olmuş, farklılık istatistiksel açıdan da önemli bulunmuştur. Boğum eksplantlarından oluşan sürgün sayısı ortalama 3,33 adet ve yeni gelişen sürgünlerin boyu 0,78 cm olmuş, sürgün ucu kültürlerine göre her iki özellik bakımından fark önemli çıkmıştır. Her iki eksplant tipinde ana eksplantların tamamında uzama olmuş, ana eksplant boyundaki artış boğum kültürlerinde sürgün ucu kültürlerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde kaydedilmiştir (Tablo 3.11).

Tablo 3.10. Ulaşlı 1 genotipinde genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)

Ulaşlı 1	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)
Sürgün ucu	93,33	0,00	6,67
Boğumlu eksplant	80,00	13,33	6,67
Ortalama	86,67	6,66	6,67

Tablo 3.11. Ulaşlı 1 genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı (%), sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi

Ulaşlı 1	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Uzama oluşturan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant uzaması (cm)
Sürgün ucu	0,00b*	0,00b	0,00b	100	0,91b
Boğumlu eksplant	75,00a	3,33a	0,78a	100	1,75a
Ortalama	37,50	1,67	0,39	100	1,33

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).

3.2.5. Ereğli genotipinde ilk dikim sonuçları

Ereğli genotipi ilk kültürlerde, özellikle boğumlu eksplantların kültürlerinde yaşama oranının kararmaya bağlı olarak düşük olduğu bir genotiptir. İki materyal tipi arasında yaşama oranı ve kararma bakımından istatistiksel farklılık %5 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.12). Boğumlu eksplantlarda proliferasyon oluşurken (%16,67), ana eksplantlarda ortalama 0,87 cm uzama olmuştur (Tablo 3.13).

İlk dikim aşamasında kocayemiş genotiplerinde sürgün ucu eksplantlarının boylanma durumu şekil 3.6'dadır. İlk dikim aşamasındaki bir kısım eksplantlara ait görüntüler şekil 3.7'de gösterilmiştir. İlk dikimde boğumlu eksplantların boylanma durumu şekil 3.8'de, kocayemiş genotiplerinde ilk dikimde yaşama ve proliferasyon oranları ise şekil 3.9'da verilmiştir.

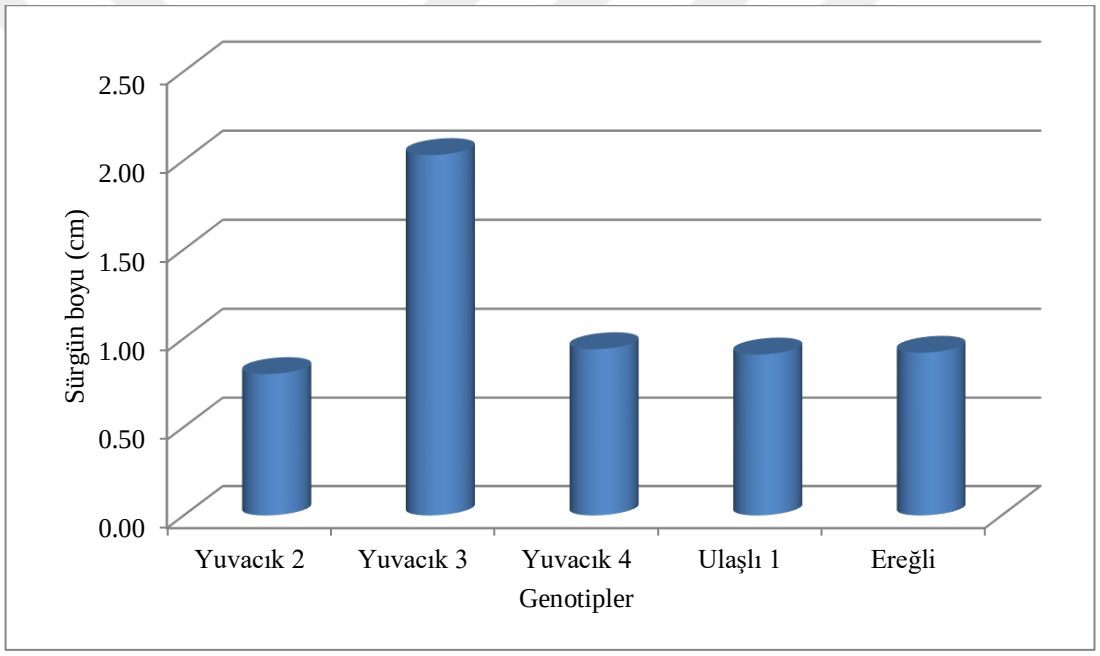
Tablo 3.12. Ereğli genotipinde genotipinde ilk dikim kültürlerinde yaşama, enfeksiyon ve kararma oranları (%)

Ereğli	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)
Sürgün ucu	66,67a*	13,33	20,00b
Boğumlu eksplant	40,00b	6,67	53,33a
Ortalama	53,33	10,00	36,67

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).

Tablo 3.13. Ereğli genotipinde ilk dikim kültürlerinde proliferasyon oranı (%), sürgün gelişimi ve ana eksplant gelişimi

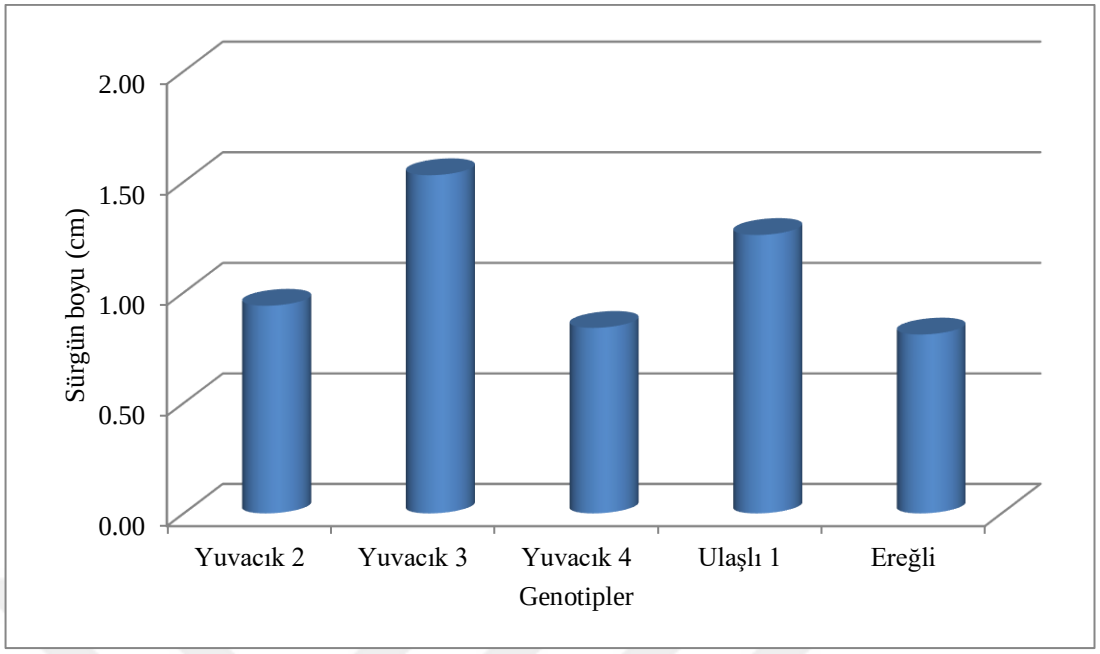
Ereğli	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Uzama oluşturan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant uzaması (cm)
Sürgün ucu	0,00	0,00	0,00	100	0,92
Boğumlu eksplant	16,67	1,00	0,20	100	0,81
Ortalama	8,34	0,50	0,10	100	0,87



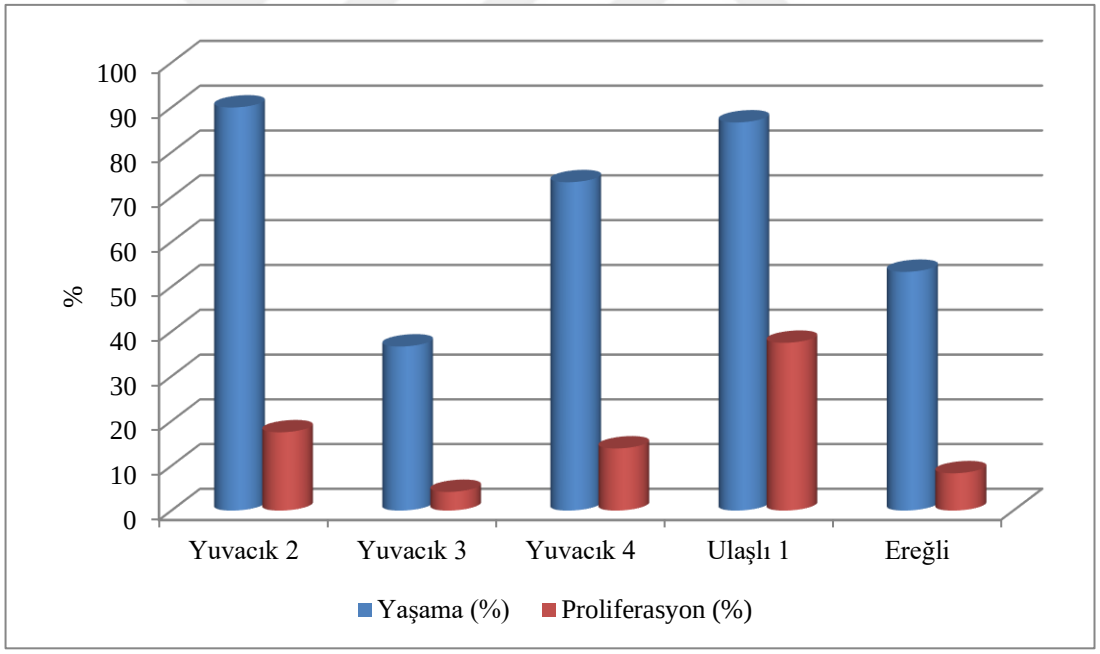
Şekil 3.6. İlk dikim aşamasında farklı kocayemiş genotiplerinde sürgün ucu ana eksplantlarının hormonsuz MS besin ortamındaki boylanma durumu



Şekil 3.7 İlk dikim aşamasındaki eksplantlar



Şekil 3.8. İlk dikim aşamasında farklı kocayemiş genotiplerinde boğumlu ana eksplantların hormonsuz MS besin ortamındaki boylanma durumu



Şekil 3.9. Kocayemiş genotiplerinde ilk dikimde yaşama ve proliferasyon oranları

3.3. Alt Kültür Çalışmaları

Alt kültürlerde MS temel besin ortamına 0,1 mg/l GA_3 sabit olmak koşuluyla, 0-0,5-1-2 ve 4 mg/l BAP dozlarından biri ilave edilmiştir. Yuvacık 2, Yuvacık 4, Ulaşlı 1 ve Ereğli genotiplerine ait eksplantların yer aldığı çalışmada, genotiplerin

yaşama oranları, kullanılan besin ortamlarının sürgün verimi ve gelişimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

3.3.1. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar

Yaşama oranları üzerine, BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Yuvacık 2 genotipinin alt kültür çalışmalarında 1 mg/l BAP ortamında görülen enfeksiyon dışında kültürlerde enfeksiyon ve içsel kararma ortaya çıkmamıştır. Dikilen ana eksplantların gelişimi değerlendirildiğinde, ana eksplant uzaması bakımından BAP dozlarının etkisi arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Yuvacık 2 genotipinde en fazla uzama 2,20 cm ortalama ile 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren kontrol ortamından elde edilmiştir (Tablo 3.14). Bu ortamda giberellik asitin (GA_3) uzamada etkisi açıktır.

Tablo 3.14. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri

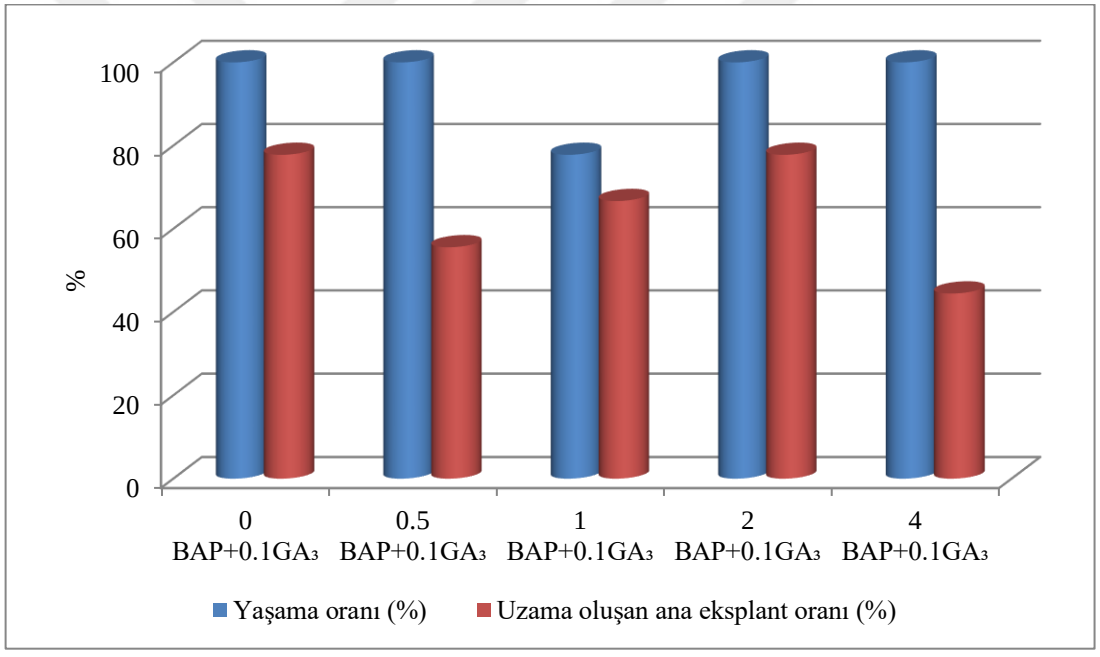
BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama (%)	Uzama oluşan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	100	77,78	2,20
0,5 + 0,1	100	55,56	1,45
1 + 0,1	77,78	66,67	0,90
2 + 0,1	100	77,78	1,34
4 + 0,1	100	44,44	1,17

En fazla yeni sürgün gelişimi 2 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiş (1,53 adet), ancak diğer BAP dozlarına ve kontrole göre fark istatistiksel bir önem oluşturmamıştır. Ortalama sürgün boyu bakımından 2 mg/l BAP içeren ortam en yüksek değeri vermiştir (1,50 cm) ve bu farklılık kontrole ve 4 mg/l BAP dozuna göre %5 düzeyinde önemli olmuştur (Tablo 3.15). Yuvacık 2 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı grafiği şekil 3.10'da gösterilmiştir. Yuvacık 2 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.15. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)
0 + 0,1	77,78	1,47	0,60c*
0,5 + 0,1	55,56	1,20	1,00abc
1+ 0,1	55,56	1,20	1,33ab
2 + 0,1	88,89	1,53	1,50a
4 + 0,1	77,78	1,47	0,80bc

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).



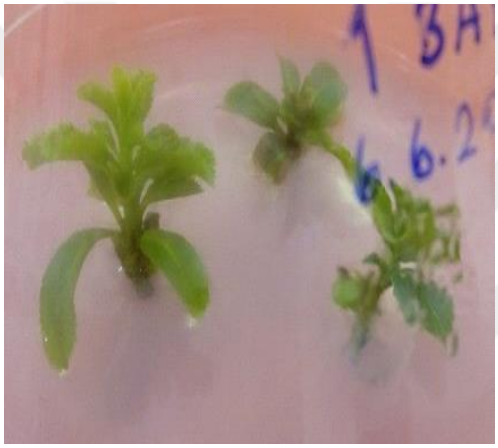
Şekil 3.10. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı



0 BAP + 0,1 GA_3



0,5 BAP + 0,1 GA_3



1 BAP + 0,1 GA_3



2 BAP + 0,1 GA_3



4 BAP + 0,1 GA_3

Şekil 3.11. Yuvacık 2 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi

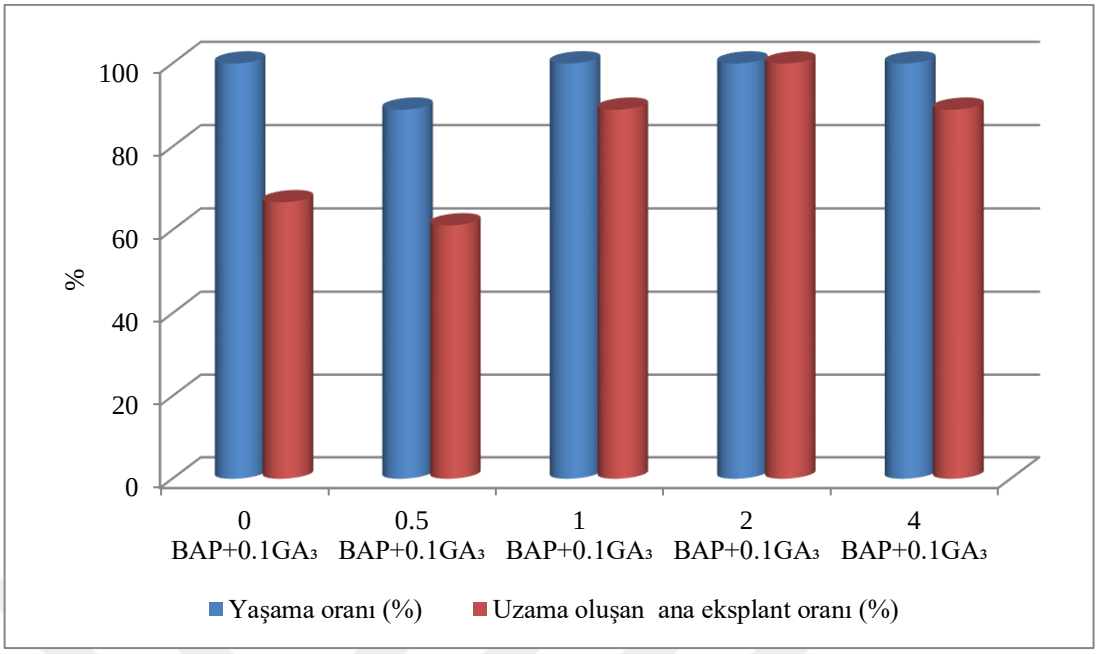
3.3.2. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar

Yaşama ve enfeksiyon oluşumu üzerine, BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu genotipin alt kültürlerinde içsel kararma oluşmamış, 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamlardaki sürgünlerde enfeksiyon sorunu yaşanmış, yaşama oranı bu dozda diğer dozlara göre düşük kalmıştır (Tablo 3.16). Yuvacık 4 genotipinde dikilen ana eksplantların gelişimi üzerine BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır, en fazla boylanma 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda 0,95 cm olarak kaydedilmiştir.

Tablo 3.16. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama (%)	Uzama oluşan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	100	66,67	0,63
0,5 + 0,1	88,89	61,11	0,62
1 + 0,1	100	88,89	0,75
2 + 0,1	100	100	0,95
4 + 0,1	100	88,89	0,93

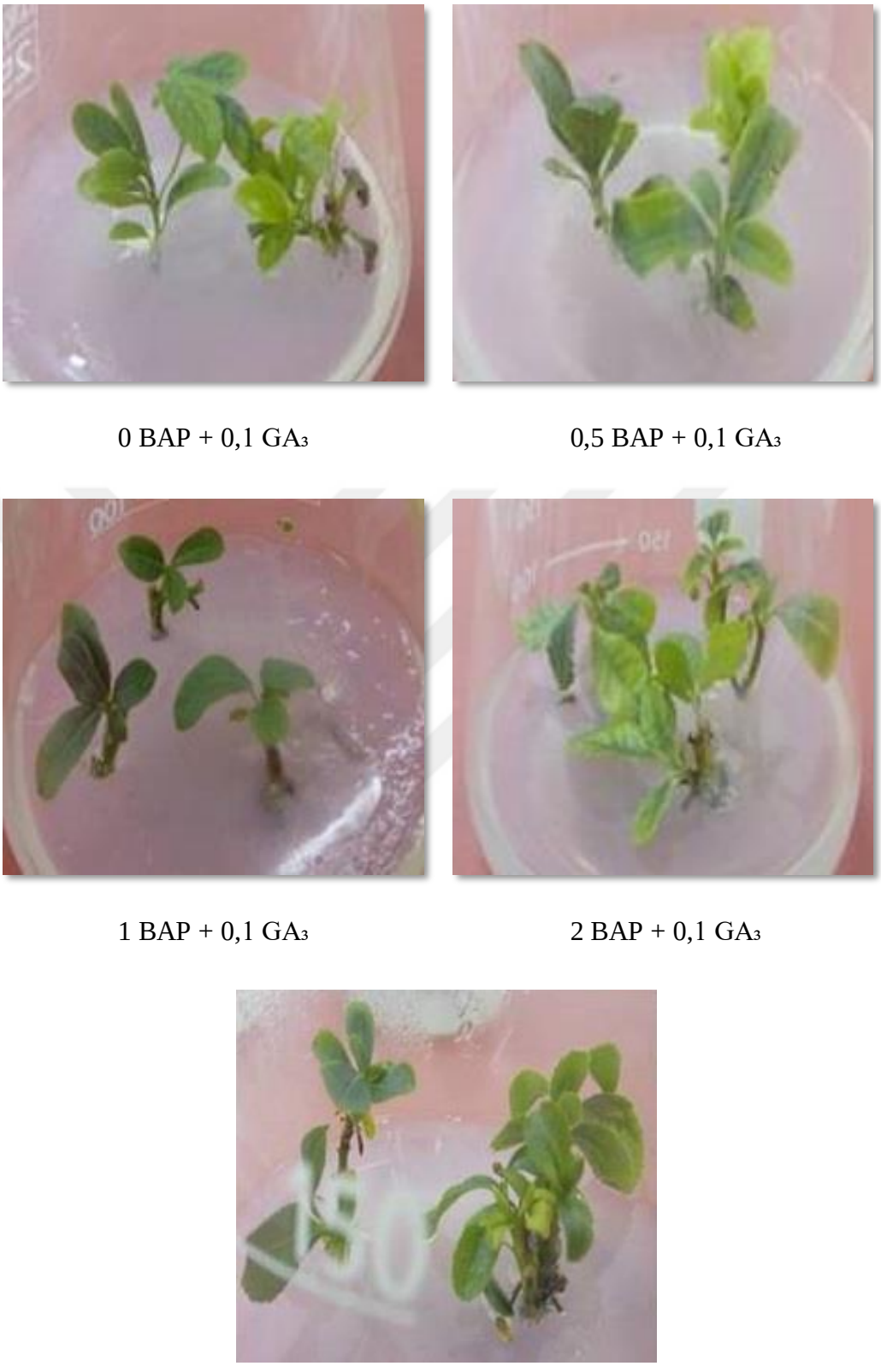
Proliferasyon oranı ve proliferasyon sonucu oluşan sürgün sayıları ile sürgün uzunlukları bakımından farklı BAP dozlarını içeren ortamlar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Kültürlerde 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda en yüksek proliferasyon oranı (%55,56) kaydedilmiş, aynı dozda sürgün verimi de artmıştır. Sürgün uzaması tüm ortamlarda 1 cm'nin altında kalmıştır (Tablo 3.17). Yuvacık 4 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranına ait grafik şekil 3.12'de gösterilmiştir. Yuvacık 4 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.13'te yer almaktadır.



Şekil 3.12. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı

Tablo 3.17. Yuvacık 4 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)
0 + 0,1	22,22	1,15	0,90
0,5 + 0,1	22,22	1,00	0,50
1 + 0,1	0,00	0,00	0,00
2 + 0,1	55,56	1,40	0,70
4 + 0,1	44,45	1,30	0,70



Şekil 3.13. Yuvacık 4 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi

3.3.3. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar

Alt kültürde, Ulaşlı 1 genotipinde yapılan gözlemlerde yaşama oranları ve enfeksiyon oluşumu bakımından BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Bu genotipin alt kültürlerinde 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortam dışındaki ortamlarda dikilen sürgünlerin tamamı canlı kalmıştır. Kültürlerde enzimatik kararma oluşmamıştır. Ulaşlı 1 genotipinde, besin ortamındaki BAP dozlarının ana sürgünlerin boylanma oranına etkileri arasında %5 düzeyinde istatistiksel fark bulunduğu ortaya konmuştur. Bu genotipte en fazla boylanma 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda (1,53 cm) olmuş, farklılık kontrole göre önem göstermiştir. Aynı dozda uzama olan ana eksplant oranı da istatistiksel olarak önemli bulunmasa da daha yüksek olmuştur (Tablo 3.18 ve Şekil 3.14). Ulaşlı 1 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3.18. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama oranı (%)	Enfeksiyon oranı (%)	Uzama oluşan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	100	0,00	22,22	0,83b*
0.5 + 0,1	100	0,00	44,44	1,48ab
1 + 0,1	100	0,00	44,44	1,17ab
2 + 0,1	88,89	11,11	66,67	1,13ab
4 + 0,1	100	0,00	88,89	1,53a

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P \leq 0,05$).

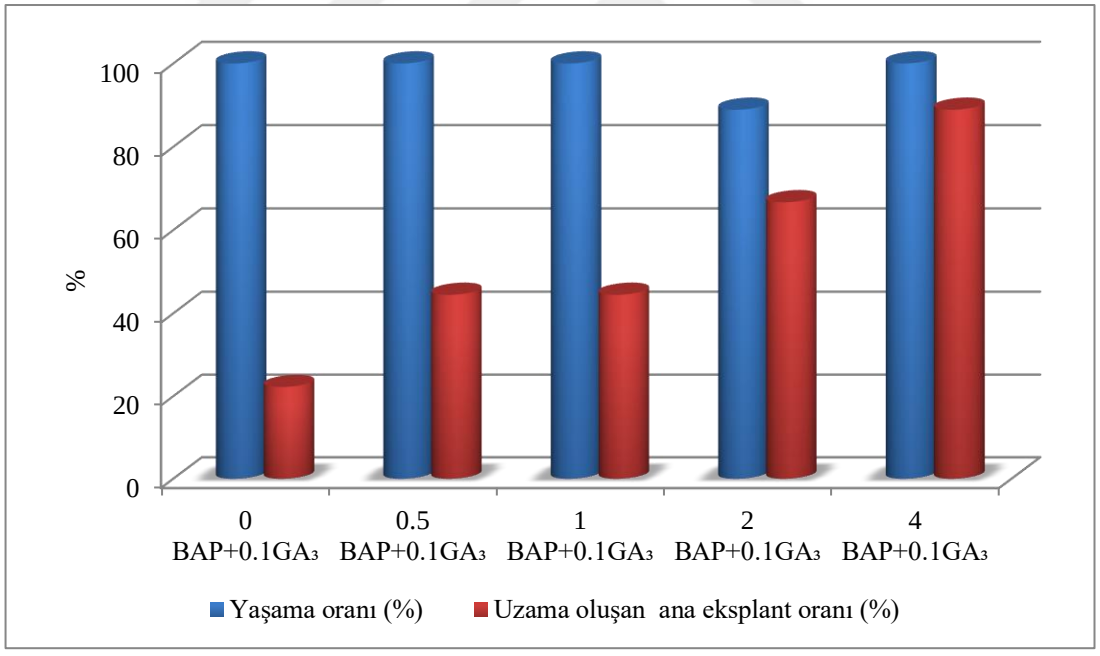
En yüksek proliferasyon oranı (%88,89) BAP içermeyen kontrol ortamlarından alınmış, ancak kontrole ve büyüme düzenleyici içeren ortamlara göre bu farklılık önemli bulunmamıştır. Kontrol ortamında 1,77 adet ile en fazla sürgün sayısı elde edilmiş ancak sürgün boyu BAP içeren ortamlara göre daha kısa (0,94) olmuştur. Gerek sürgün verimi, gerekse sürgün uzunluğu bakımından uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Sadece Ulaşlı 1 genotipinde alt kültürlerde, kontrol dışında tüm BAP dozlarında sürgünlerin yapraklarında irileşme saptanmış ve istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Kontrol ile 2 mg/l BAP + 0,1

mg/l GA_3 içeren ortamda yaprak irileşme oranı daha düşük olmuş ve bu iki ortam istatistiksel olarak aynı grup içinde yer almıştır (Tablo 3.19).

Tablo 3.19. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)	Yaprak irileşmesi (%)
0 + 0,1	88,89	1,77	0,94	0,00b*
0.5 + 0,1	55,56	1,33	1,42	33,33a
1 + 0,1	66,67	1,43	1,25	33,33a
2 + 0,1	61,11	1,33	1,33	27,78ab
4 + 0,1	55,56	1,33	1,53	33,33a

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).



Şekil 3.14. Ulaşlı 1 genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı



0 BAP + 0,1 GA_3



0,5 BAP + 0,1 GA_3



1 BAP + 0,1 GA_3



2 BAP + 0,1 GA_3



4 BAP + 0,1 GA_3

Şekil 3.15. Ulaşlı 1 genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi

3.3.4. Ereğli genotipinde alt kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar

Ereğli genotipinin alt kültürlerinde kararma oranı yüksek olmuş, bu nedenle sürgünlerde ölüm oranı artmıştır (Şekil 3.16). En yüksek kararma oranı (%73,33) 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda olmuş, BAP dozunun artışı enzimlerin etkisini artırmıştır (Tablo 3.20). Kararmaya bağlı olarak oluşan eksplant ölümleri nedeniyle Ereğli genotipine çoğaltma aşamasında yer verilememiştir. Ereğli genotipi eksplantlarında uzama gösterenlerin oranı diğer genotiplere göre daha düşük oranlarda olmuştur. En fazla uzama 1,44 cm olarak 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 dozunda ölçülmüştür. Söz konusu genotipin ana eksplantlarının boylarının büyümesine farklı BAP dozlarının etkileri %5 düzeyinde önemli bulunmuştur.



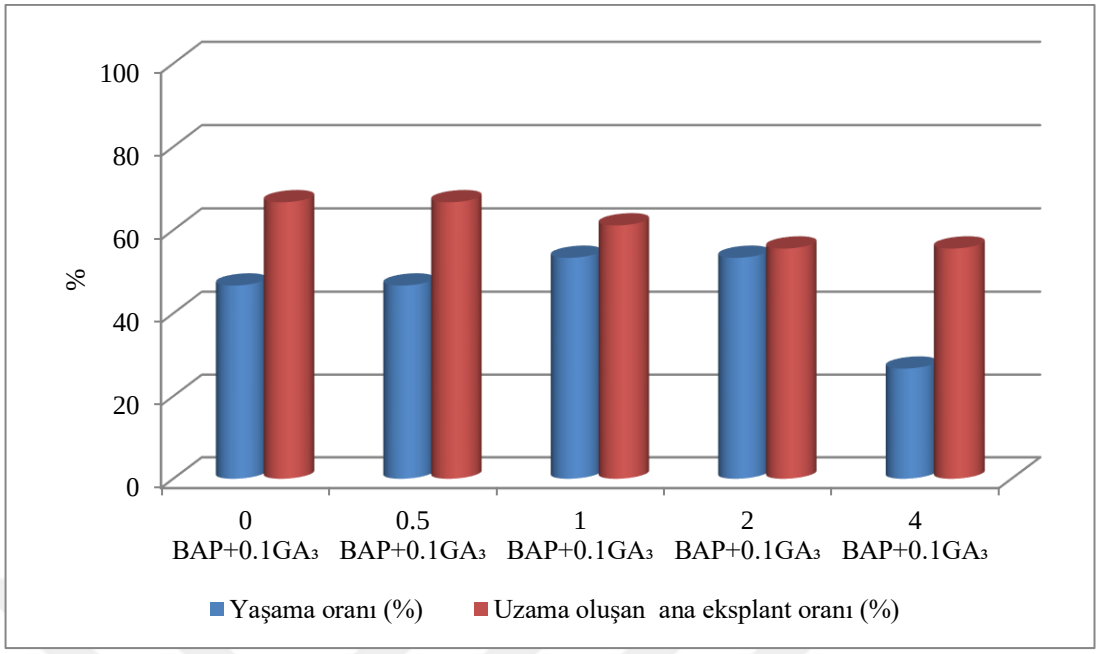
Şekil 3.16. Ereğli genotipinde alt kültürlerde sürgün kararması

Ereğli genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranına ait grafik şekil 3.17'de gösterilmiştir.

Tablo 3.20. Ereğli genotipinde alt kültür ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişmesi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama oranı (%)	Kararma oranı (%)	Uzama oluşan ana eksplant oranı (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	46,67	53,33	66,67	0,99ab*
0,5 + 0,1	46,67	53,33	66,67	0,68ab
1 + 0,1	53,33	46,67	61,11	1,02ab
2 + 0,1	53,33	46,67	55,55	1,44a
4 + 0,1	26,67	73,33	55,56	0,52b

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).



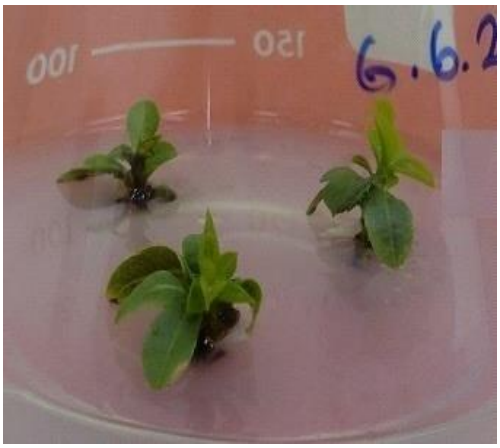
Şekil 3.17. Ereğli genotipinde alt kültür aşamasında yaşama oranı ve uzama oluşan ana eksplant oranı

Tablo 3.21. Ereğli genotipinde alt kültür ortamında proliferasyon ve sürgün gelişimi

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün boyu (cm)
0 + 0,1	44,44	1,17	1,13ab*
0,5 + 0,1	33,33	1,00	0,55ab
1 + 0,1	50,00	1,17	1,15ab
2 + 0,1	55,56	1,33	1,44a
4 + 0,1	55,56	1,33	0,50b

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).

Ereğli genotipinde büyüme düzenleyici dozları arasında proliferasyonda etki bakımından önemli bir fark çıkmamış, 2 mg/l BAP + 0,1 GA_3 ve 4 mg/l BAP + 0,1 GA_3 içeren ortamlarda diğer ortamlara göre daha yüksek proliferasyon görülmüştür (%55,56). 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 ile 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamlarda 1,33 adet sürgün oluşmuştur. Oluşan yeni sürgünlerde en fazla uzama ise 2 mg/l BAP içeren ortamda saptanmış (1,44 cm) ve %5 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 3.21). Ereğli genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.18'de yer almaktadır.



0 BAP + 0,1 GA_3



0,5 BAP + 0,1 GA_3



1 BAP + 0,1 GA_3



2 BAP + 0,1 GA_3



4 BAP + 0,1 GA_3

Şekil 3.18. Ereğli genotipinde, alt kültürde BAP dozlarının sürgün boyuna etkisi

3.4. Sürgün Çoğaltma Çalışmaları

3.4.1. MS besin ortamında sürgünlerin çoğaltılması

Sürgün çoğaltma aşamasında MS ortamında 0,25 mg/l GA_3 ve 0,5 mg/l IBA sabit olmak koşuluyla 1-2-4 ve 6 mg/l BAP dozları kullanılmıştır. Çoğaltma aşamasında denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş, her tekerrürde 3 adet eksplant yer almıştır. Genotiplerden elde edilen sonuçların istatistiksel analizi ayrı ayrı yapılmıştır. Kültürler 250 ml'lik erlenmayerlerde oluşturulmuş, her erlene 50 ml besin ortamı konulmuştur. Yuvacık 2 ve Ulaşlı 1 genotiplerine ait eksplantların kullanıldığı çalışmada ölümler enzimatik kararma kaynaklı olmuş, çoğaltma aşamasında enfeksiyon problemi yaşanmamıştır. Kültüre alınan sürgünlerde proliferasyon olmamış, kullanılan büyüme düzenleyici dozlarının dikilen eksplantlarda yaşama oranı (%) ve boylanması üzerine büyüme düzenleyicilerinin etkileri değerlendirilmiştir.

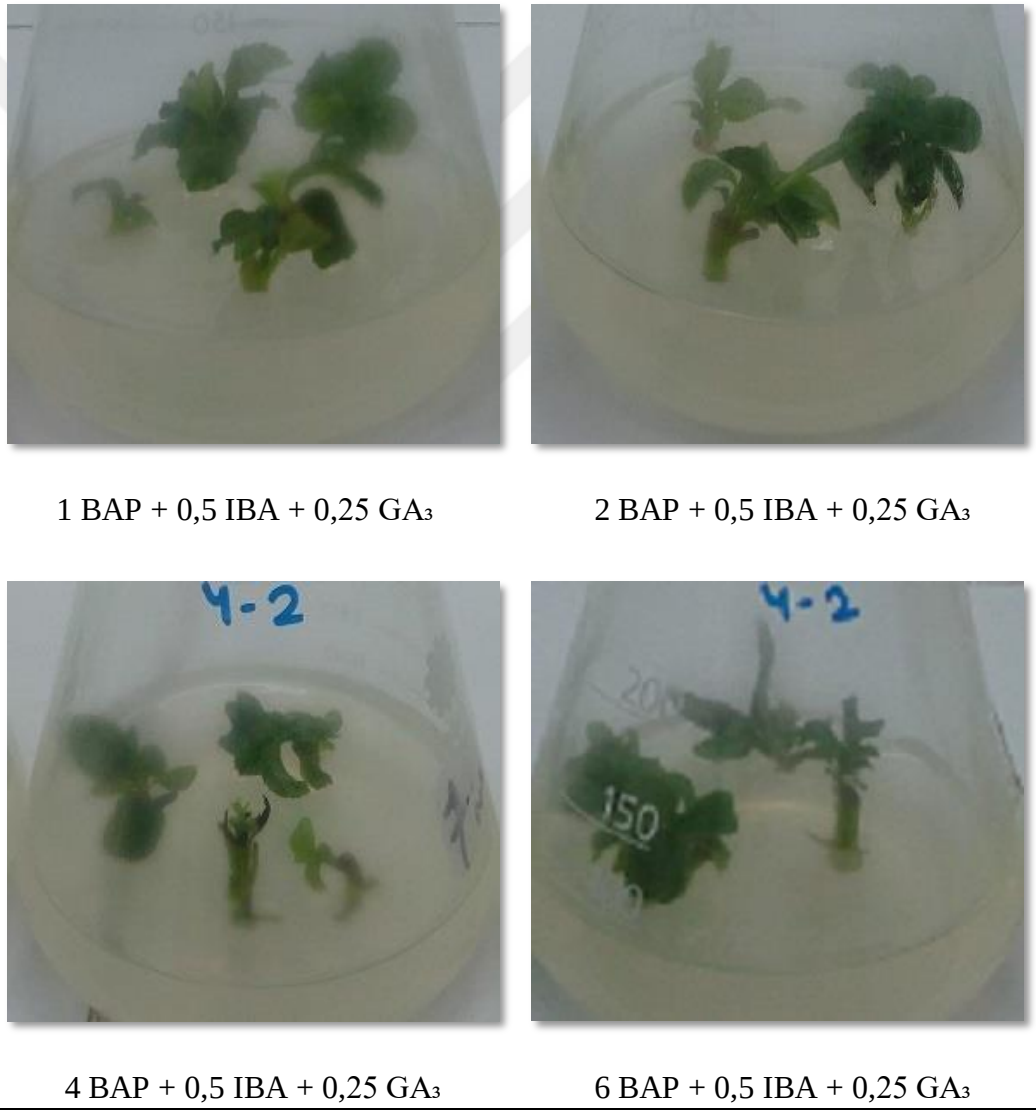
3.4.1.1. Yuvacık 2 genotipinde MS besin ortamında çoğaltılma aşamasında elde edilen sonuçlar

Yaşama oranları üzerine, farklı BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Yuvacık 2 genotipinde en yüksek yaşama oranı %55,56 ile 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3 içeren ortamda gerçekleşmiştir. Diğer ortamların hepsinde yaşama oranı %44,44 olarak meydana gelmiştir.

Ana sürgün uzamasına BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En fazla uzama 1,08 cm ortalaması ile 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3 içeren ortamdan elde edilmiştir (Tablo 3.22). Yuvacık 2 genotipine ait sürgünlerin gelişim durumları şekil 3.19'da verilmiştir. Bu genotipte proliferasyon oluşmadığından yeni sürgün sayısı belirlenmemiştir.

Tablo 3.22. Yuvacık 2 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişimi üzerindeki etkileri

Ortam (MS)	Yaşama Oranı (%)	Ana Sürgün Boyu (cm)
1 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	55,56	1,08
2 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	44,44	1,03
4 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	44,44	0,73
6 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	44,44	1,03



1 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3 2 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3

4 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3 6 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3

Şekil 3.19. Yuvacık 2 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi

3.4.1.2. Ulaşlı 1 genotipinde MS besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar

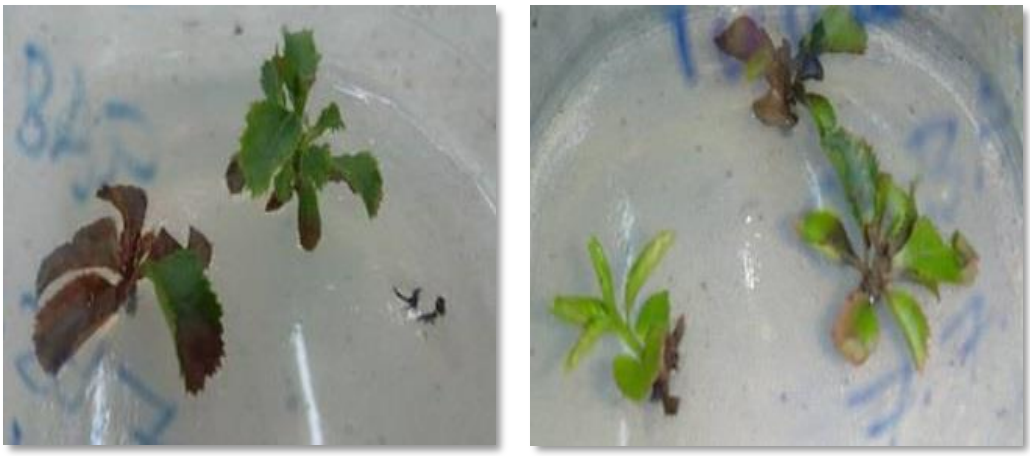
Eksplantların yaşama oranları üzerine, farklı BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ulaşlı 1 genotipinde en yüksek yaşama oranı %55,55 ile 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l GA_3 içeren ortamda gerçekleşmiştir. Diğer ortamların hepsinde yaşama oranı %33,33 olmuş, enzimatik kararmanın çoğaltma aşamasında yüksek oranlarda seyrettiği bu genotipte çok sağlıklı sürgün gelişimi elde edilememiştir.

MS ortamında çoğaltma aşamasında dikilen eksplantlardan sağlıklı gelişme gösterenlerde uzama olmuş, ancak farklı BAP dozlarının bu uzama etkileri istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. En uzun sürgün boyu 2 mg/l BAP + 0,5 mg IBA + 0,25 mg/l GA_3 içeren ortamdan (0,93 cm) elde edilmiştir (Tablo 3.23). Kültürlerde proliferasyon gerçekleşmemiştir.

Tablo 3.23. Ulaşlı 1 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS ortamında farklı BAP dozlarının yaşama ve ana eksplant gelişimi üzerindeki etkileri

Ortam (MS)	Yaşama oranı (%)	Ana sürgün boyu (cm)
1 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	33,33	0,73
2 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	55,55	0,93
4 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	33,33	0,77
6 BAP + 0,25 GA_3 + 0,5 IBA	33,33	0,85

MS temel besin ortamında çoğaltılan Yuvacık 2 ve Ulaşlı 1 genotipi sürgünlerinde meydana gelen enzimatik kararmalar neticesinde istenilen sonuçlar elde edilememiş, proliferasyon oluşmamış, ana eksplantlarda ise uzama yetersiz olmuştur. Literatürlerde kocayemiş doku kültürlerinde WPM ortamının da kullanıldığı görülmektedir (Mereti ve diğ., 2002, Papafotiou ve diğ., 2013). Sonraki çalışmalara WPM besin ortamında devam edilmiştir. Ulaşlı 1 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi ile ilgili fotoğraflar şekil 3.20'de gösterilmiştir.



1 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3 2 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3



4 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3 6 BAP + 0,5 IBA + 0,25 GA_3

Şekil 3.20. Ulaşlı 1 genotipinde, çoğaltma aşamasında MS besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi

3.4.2. WPM besin ortamında sürgünlerin çoğaltılması

MS temel besin ortamında sürgünlerin gelişiminin yeterli olmaması nedeniyle, sonraki sürgün çoğaltma aşaması; WPM besin ortamında 0,1 mg/l GA_3 sabit olmak şartıyla 0-1-2 ve 4 mg/l BAP dozlarından birini içeren ortamlarda yürütülmüştür. Sürgün çoğaltma çalışmalarında Yuvacık 2, Yuvacık 4 ve Ulaşlı 1 genotiplerinin eksplantları kullanılmıştır. Yeterli sürgün elde edebilmek amacıyla, yeniden üretilen apomiktik sürgünler ile MS çoğaltma ortamlarından gelen sürgünler önce WPM hormonsuz besin ortamında 7 gün süre ile kültüre alınmış, ortam farklılığının etkisi giderildikten sonra WPM besin ortamlarındaki büyüme düzenleyici kombinasyonlarına şaşırtılmıştır. Bu ortamlarda, genotipler bazında sürgünlerde

enfeksiyon ve kararma oluşumu, yaşama ve proliferasyon oranı, ana eksplant gelişimi, sürgün verimi ve oluşan yeni sürgünlerin uzunlukları değerlendirilmiştir. Birinci sürgün çoğaltma aşamasında görülen yüksek oranda kararma ve enfeksiyon nedeniyle Ereğli genotipi çalışmadan çıkarılmıştır.

3.4.2.1. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar

Bu genotipte, WPM besin ortamında farklı BAP dozlarını içeren ortamlarda kültüre alınan sürgünlerde canlılık, enfeksiyon ve kararma gelişimi üzerine dozlar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenmemiştir. Kültür ortamlarına dikilen ana eksplantların gelişimi üzerine büyüme düzenleyici dozlarının etkileri önemli bulunmamıştır. Eksplantların tamamında uzama olmuş, en fazla boylanma 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 dozlarında olmuştur (Tablo 3.24). Proliferasyon oluşumu üzerine WPM ortamında farklı BAP dozlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş, 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda sürgünlerin tamamı proliferasyon sağlamıştır. Sürgün verimi 1,33 adet ile 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 ve 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 ortamlarında diğer ortamlardan daha yüksek olmuş, aradaki farklılık istatistiksel bir önem göstermemiştir. Yeni gelişen sürgün uzunlukları üzerine WPM ortamında farklı BAP dozlarının etkileri incelendiğinde, aradaki farklılık %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. En uzun sürgün boyu 1,75 cm ile 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamdan elde edilmiştir (Tablo 3.25 ve Şekil 3.21).

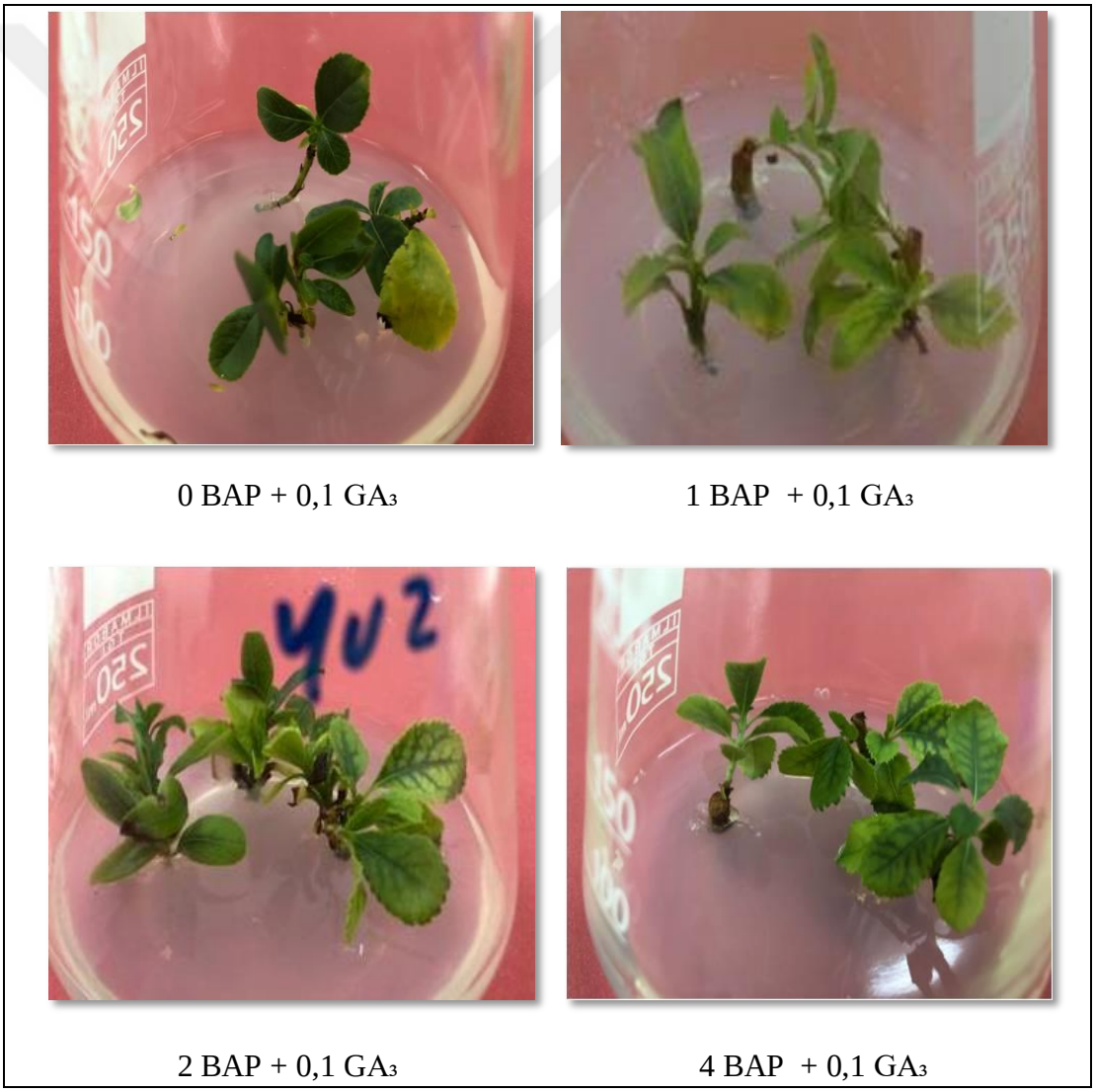
Tablo 3.24. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama (%)	Enfeksiyon (%)	Kararma (%)	Uzama oluşan ana eksplant (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	77,78	11,11	11,11	100	1,43
1 + 0,1	88,89	0,00	11,11	100	1,63
2 + 0,1	77,78	0,00	22,22	100	1,90
4 + 0,1	77,78	11,11	11,11	100	1,53

Tablo 3.25. Yuvacık 2 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün uzunluğu (cm)
0 + 0,1	44,44b*	1,00	0,74b
1 + 0,1	55,55ab	1,33	0,79b
2 + 0,1	100a	1,33	1,75a
4 + 0,1	55,55ab	1,17	1,25ab

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05)



0 BAP + 0,1 GA_3 1 BAP + 0,1 GA_3

2 BAP + 0,1 GA_3 4 BAP + 0,1 GA_3

Şekil 3.21.Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi

3.4.2.2. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar

Yuvacık 4 genotipinde çoğaltma ortamlarına dikilen sürgünlerde enfeksiyon oluşmamış, yaşama oranı ve sürgün kararması bakımından uygulamalar arasında istatistiksel bir fark ortaya çıkmamıştır. 4 mg/l BAP + 0,1mg/l GA_3 içeren ortam dışında, diğer ortamlarda kararmalar görülmüş ve sürgün ölümleri gerçekleşmiştir. Dikilen ana eksplantlarda uzama oluşan ana sürgün oranı BAP içermeyen ortamda, sürgünlerdeki uzama ise 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda artmıştır (Tablo 3.26). WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.22'de gösterilmiştir.

Tablo 3.26. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri

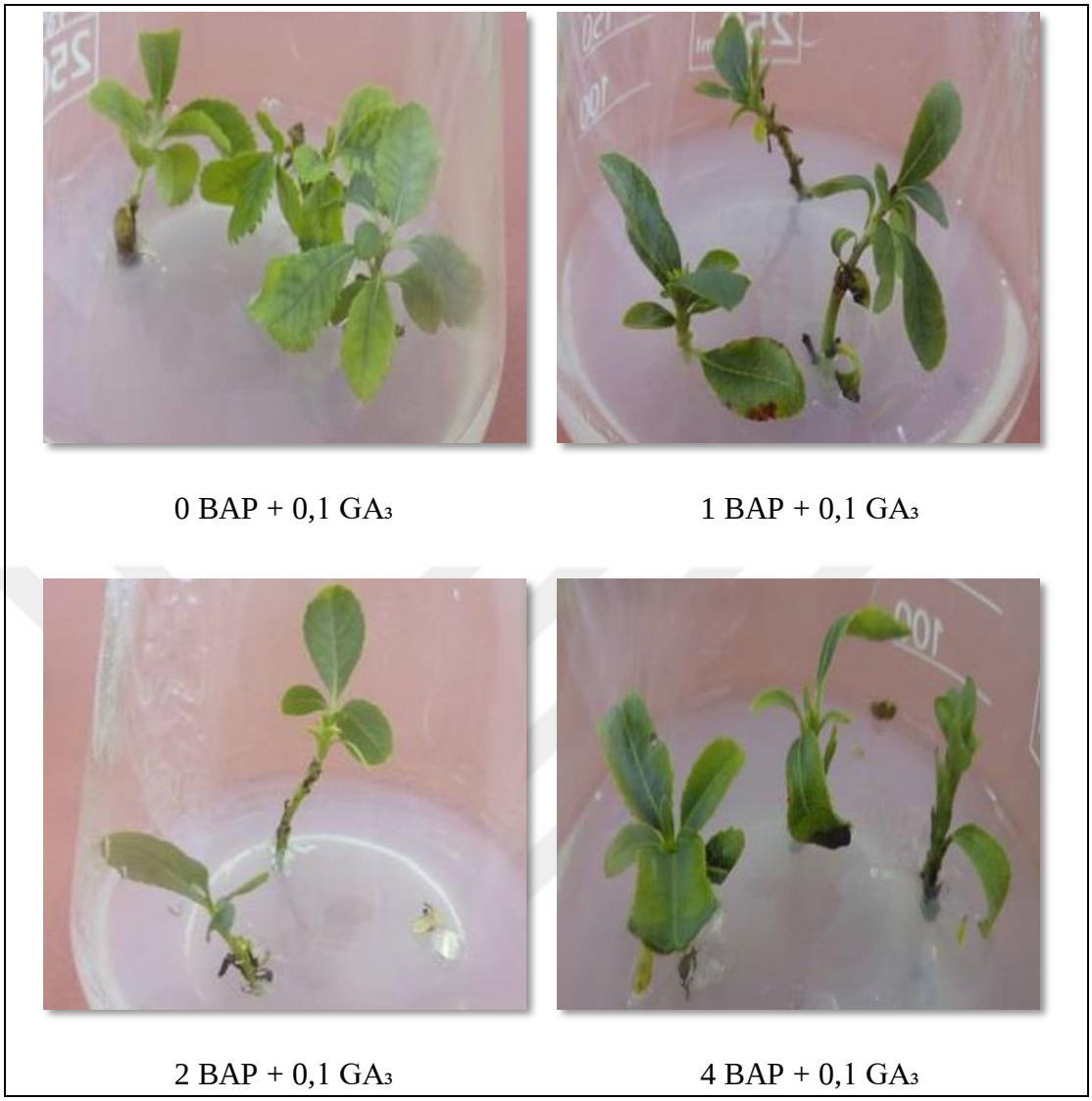
BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama (%)	İçsel Kararma (%)	Uzama oluşan ana eksplant (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0+ 0,1	77,78	22,22	88,89	0,83
1 + 0,1	66,67	33,33	55,56	1,10
2 + 0,1	66,67	33,33	55,56	0,70
4 + 0,1	100	0,00	55,56	1,00

Yuvacık 4 genotipinde çoğaltma ortamına dikilen sürgünlerde en fazla çoğalım BAP içermeyen ortamda belirlenmiş, ancak proliferasyon oranı bakımından farklı BAP dozları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık belirlenmemiştir. Sürgün sayısı ve oluşan sürgünlerin uzunluğu yine BAP içermeyen ortamda en yüksek olmuş, sürgün uzunluğu bakımından BAP dozunun etkisi ($P \leq 0,05$) önemli olmuştur (Tablo 3.27).

Tablo 3.27. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün uzunluğu (cm)
0 + 0,1	44,44	1,00	1,10a*
1 + 0,1	22,22	0,67	0,75a
2 + 0,1	0,00	0,00	0,00b
4 + 0,1	33,33	0,33	0,71ab

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P \leq 0,05$)



Şekil 3.22.Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi

3.4.2.3. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında elde edilen sonuçlar

Ulaşlı 1 genotipinde incelenen parametreler bakımından istatistiksel bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Kültürlerde sürgün kararması oluşmamış, 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamlar dışındaki tüm ortamlarda düşük oranda enfeksiyon oluşmuştur. Ana eksplantların tamamında, tüm büyüme düzenleyici dozlarında uzama oluşmuş (%100), 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda 1,37 cm ile en uzun sürgün boyu ölçülmüştür (Tablo 3.28). Ulaşlı 1 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisini gösteren fotoğraflar şekil 3.23'tedir.

Tablo 3.28. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgünlerin yaşama ve gelişmesi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Yaşama (%)	Enfeksiyon (%)	Uzama oluşan ana eksplant (%)	Ana eksplant boyu (cm)
0 + 0,1	88,89	11,11	100	1,03
1 + 0,1	88,89	11,11	100	1,13
2 + 0,1	100	0,00	100	1,37
4 + 0,1	77,78	22,22	100	0,93



Şekil 3.23. Ulaşlı 1 genotipinde, WPM besin ortamında BAP dozlarının kültürlerin gelişimine etkisi

Tablo 3.29. Ulaşlı 1 genotipinde WPM besin ortamında çoğaltma aşamasında farklı BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve yeni sürgün gelişimi üzerine etkileri

BAP + GA_3 (mg/l)	Proliferasyon oranı (%)	Yeni oluşan sürgün sayısı (adet)	Yeni sürgün uzunluğu (cm)
0 + 0,1	38,89	1,00	1,24
1 + 0,1	33,33	1,00	1,18
2 + 0,1	55,56	1,33	1,38
4 + 0,1	44,44	1,11	0,96

Ulaşlı 1 genotipinde proliferasyon oranı (%55,56), sürgün verimi (1,33 adet) ve sürgün boyu (1,38 cm) 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 içeren ortamda en yüksek değerlerde kaydedilmiştir (Tablo 3.29). Uygulamalar arasında istatistiksel bir farklılık belirlenememiştir.

3.5. Köklenme Ortamı Sonuçları

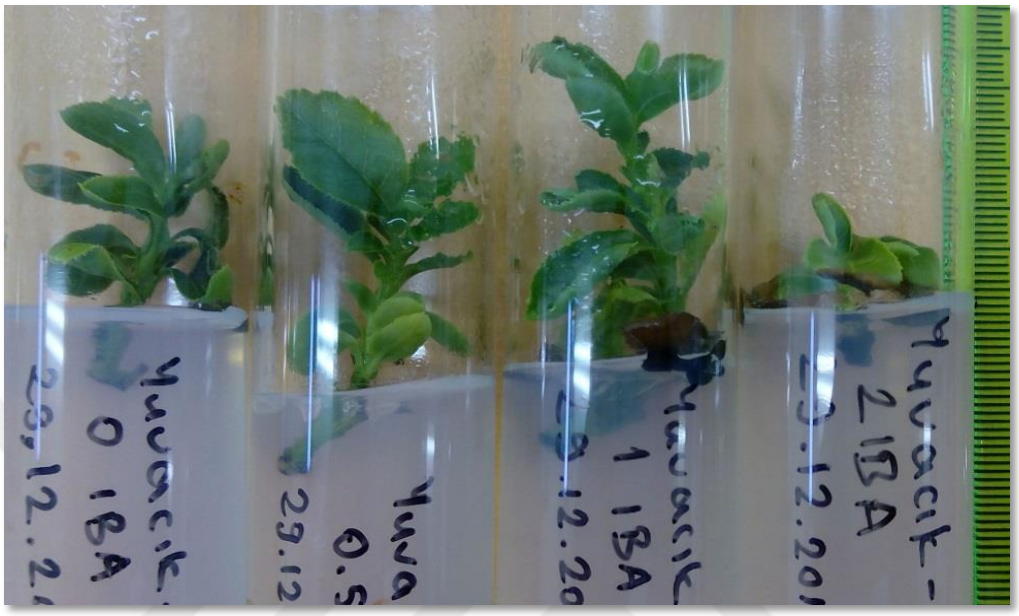
3.5.1. MS köklenme ortamı sonuçları

MS besin ortamında çoğaltılan genotiplerden köklenme ortamına alınabilecek nitelikte yeterli sayıda sürgün Yuvacık 2 genotipinden elde edilebilmiş ve IBA'nın 0,5-1-2 mg/l dozlarından biri ile birlikte 0,25 mg/l BAP ve 0,1 mg/l GA_3 eklenen MS temel besin ortamında bu genotipin eksplantları köklenmeye alınmıştır. Çoğaltma aşamasında sürgün gelişiminin zayıf kalması nedeniyle, yapılan literatür taramaları sonucunda, köklenme ortamlarına BAP ve GA_3 eklenmiştir.

Köklenme ortamında sürgünlerin yaşama oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. En yüksek yaşama oranı (%100) 2 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 köklenme ortamında görülmüştür. Köklenme ortamına dikilen Yuvacık 2 sürgünlerinde dikimden itibaren 40 gün boyunca gözlem yapılmış, ancak kök oluşumu gerçekleşmemiştir (Tablo 3.30). BAP dozunun etkisi sonucunda olduğu düşünülen kallus oluşumu (0,3-0,8 cm) çalışmamızda gözlenmiştir. Veriler çalışmada yer almamıştır.

Sürgünlerde kültür süresince uzama olmuştur. Köklenme ortamında sürgün boyu uzunluğuna ortamların etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En uzun sürgün boyu (1,59 cm) 1 mg/l IBA + 0,25 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 ortamında

yapılan ölçümde görülmüştür (Şekil 3.24 ve Şekil 3.26). Sürgünlerde köklenme ortamlarında gözlemlenen kallus gelişimi ile ilgili fotoğraf şekil 3.25' te gösterilmiştir.



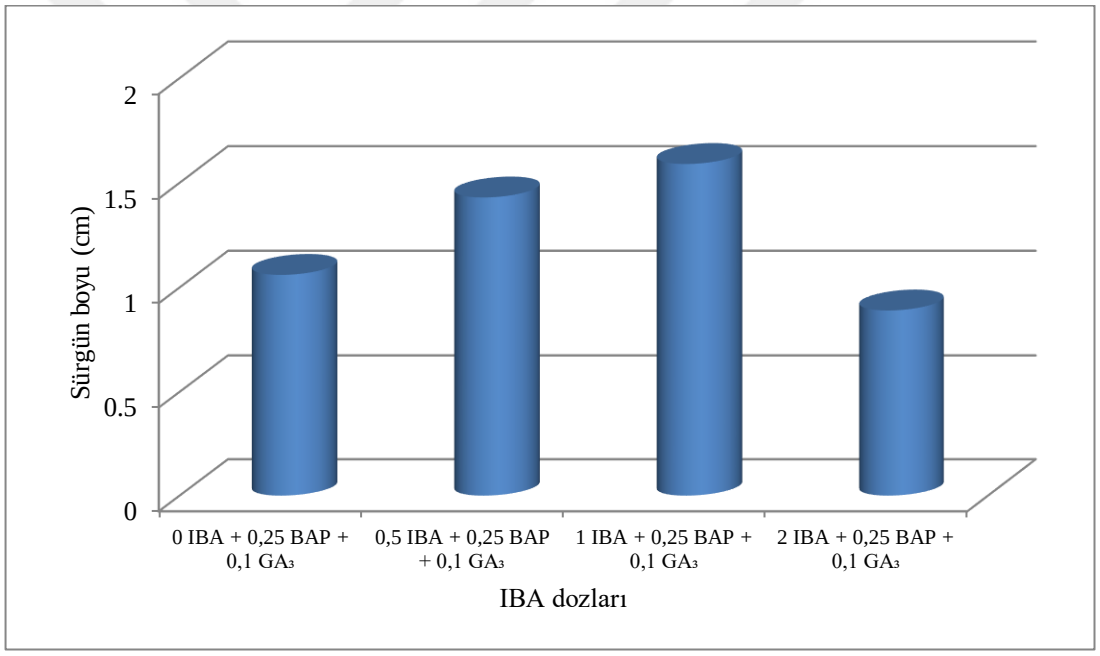
Şekil 3.24. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında IBA dozlarında sürgün boyları

Tablo 3.30. MS besin ortamında IBA dozlarının köklenme üzerine etkisi

Köklendirme Ortamı	Canlı Eksplant (%)	Enfeksiyon (%)	Kararma (%)	Köklenme Oranı (%)
0 IBA + 0,25 BAP + 0,1 GA_3	44,67	11,00	44,33	0,00
0,5 IBA + 0,25 BAP + 0,1 GA_3	77,67	22,33	0,00	0,00
1 IBA + 0,25 BAP + 0,1 GA_3	66,67	11,00	22,33	0,00
2 IBA + 0,25 BAP + 0,1 GA_3	100	0,00	0,00	0,00



Şekil 3.25. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında köklenme aşamasında kallus oluşumu



Şekil 3.26. Yuvacık 2 genotipinde, MS besin ortamında köklenme aşamasında sürgün boyu gelişimi

3.5.2. WPM köklenme ortamı sonuçları

WPM ortamında çoğaltılan sürgünler, köklenme aşamasında da yine WPM besin ortamına alınmış ve çalışmalara devam edilmiştir. Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotiplerinden sağlıklı gelişen sürgünler köklenme ortamlarına dikilmiştir. WPM temel besin ortamına IBA veya NAA'nın 1-2-4 mg/l dozlarından biri eklenmiştir.

3.5.2.1. Yuvacık 2 genotipinde WPM köklenme ortamı sonuçları

Yuvacık 2 genotipinde köklenmede, 1 mg/l ve 2 mg/l NAA içeren ortamlardaki sürgünlerde enfeksiyon nedeniyle kayıplar olmuştur. Köklenme oranı üzerine büyüme düzenleyici x doz interaksiyonu önemli çıkmıştır. En yüksek köklenme oranı 2 mg/l IBA dozunda kaydedilmiş, 1 mg/l IBA dozuna göre farklılık istatistiksel olarak önemli olmuştur. Kök sayısı 2 mg/l IBA, 4 mg/l IBA ve 4 mg/l NAA dozlarında diğer dozlara göre önemli sayıda artış göstermiştir (sırasıyla 6,25 adet, 6 adet ve 5,50 adet). Kök uzunluğu bakımından da büyüme düzenleyici x doz interaksiyonu istatistiksel anlamda önemli bulunmuş, en uzun kökler (1,38 cm) 2 mg/l IBA dozunda oluşmuştur (Tablo 3.31).

Tablo 3.31. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında IBA ve NAA dozlarının köklenme üzerine etkileri

Büyüme Düzenleyici	Yaşama Oranı (%)	Köklenme (%)	Kök Sayısı (adet)	Kök Uzunluğu (cm)	Kallus Oranı (%)
1 mg/l IBA	100	22,22b*	3,00b	0,86b	77,73a
2 mg/l IBA	100	77,77a	6,25a	1,38a	33,33ab
4 mg/l IBA	100	55,55ab	6,00a	0,89b	55,55ab
1 mg/l NAA	88,88	66,66ab	3,75b	0,58c	11,11b
2 mg/l NAA	88,88	55,55ab	3,00b	0,40d	33,33ab
4 mg/l NAA	100	44,44ab	5,50a	0,38d	55,5ab

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05)

1 mg/l IBA içeren ortamdaki sürgünlerde en yüksek oranda kallus oluşumu (%77,73) meydana gelmiştir. Yuvacık 2 genotipine ait eksplantların farklı IBA dozlarındaki görüntüsü şekil 3.27'de, farklı NAA dozlarındaki görüntüsü ise şekil 3.28'de gösterilmiştir.

Tablo 3.32. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında köklenme aşamasında IBA ve NAA dozlarının kallus oluşumuna etkileri (cm)

	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	Ortalama
IBA	0,48	0,30	0,50	0,43 B*
NAA	0,60	0,40	0,50	0,50 A
Ortalama	0,54a*	0,35b	0,50a	0,47

* Küçük harfler büyüme düzenleyici dozları; büyük harfler büyüme düzenleyicileri arasındaki farkı göstermektedir (P≤0,05).

WPM köklenme ortamında sürgünlerin uzaması üzerine bitki büyüme düzenleyicileri ve dozların etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Dozlara bakılmaksızın bitki büyüme düzenleyicileri değerlendirildiğinde NAA içeren ortamlarda kallus büyüklüğü artmış, her iki bitki büyüme düzenleyicisinde 2 mg/l dozunda kallus çapı azalmıştır (Tablo 3.32).

WPM ortamında köklendirilen Yuvacık 2 sürgünlerinde IBA dozlarında NAA'ya göre sürgün boylanması artmış, her iki büyüme düzenleyicinin 2 mg/l dozunda sürgün boyları uzamıştır. Sürgün boyu bakımından büyüme düzenleyicileri ve dozlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 3.33).

Tablo 3.33. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında köklenme aşamasında IBA ve NAA dozlarının sürgün uzamasına etkileri (cm)

	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	Ortalama
IBA	1,12	1,55	0,93	1,20A*
NAA	1,05	1,18	0,82	1,02B
Ortalama	1,09b*	1,37a	0,88c	1,37

* Küçük harfler büyüme düzenleyici dozları; büyük harfler büyüme düzenleyicileri arasındaki farkı göstermektedir (P≤0,05).



(a) (b) (c)

Şekil 3.27. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında IBA dozlarının köklenmeye etkisi, a) 1 mg/l IBA, b) 2 mg/l IBA, c) 4 mg/l IBA



(a) (b) (c)

Şekil 3.28. Yuvacık 2 genotipinde, WPM besin ortamında NAA dozlarının köklenmeye etkisi, a) 1 mg/l NAA, b) 2 mg/l NAA, c) 4 mg/l NAA

3.5.2.2. Yuvacık 4 genotipinde WPM köklenme ortamı sonuçları

Yuvacık 4 genotipinde 1 mg/l NAA içeren ortamda köklenmeye alınan sürgünlerde yüksek oranda enfeksiyon sonucu sürgün canlılığı %33,33'e kadar düşmüştür. Köklenme oranı her iki oksinin 4 mg/l dozunda diğer dozlara göre istatistiksel açıdan önemli oranda artmıştır. 1 mg/l IBA, 2 mg/l IBA ve 2 mg/l NAA içeren ortamlarda

kök oluşmamıştır. Kök sayısı 1 mg/l NAA içeren ortamda en yüksek olmuş (6 adet), ancak istatistiksel olarak 4 mg/l IBA ve 4 mg/l NAA içeren ortamlarla (her ikisinde de 4 adet kök) aynı grupta yer almıştır. Bu üç büyüme düzenleyici dozu da kök sayısı bakımından benzer etki göstermiştir (Tablo 3.34, Şekil 3.29 ve Şekil 3.30).

Tablo 3.34. Yuvacık 4 genotipinde WPM besin ortamında IBA ve NAA dozlarının canlılık, köklenme ve sürgün gelişimi üzerine etkileri

Büyüme Düzenleyici	Köklenme (%)	Kök Sayısı (adet)	Kök Uzunluğu (cm)	Kallus Oranı (%)	Kallus çapı (cm)	Sürgün boyu (cm)
1 mg/l IBA	0,00c*	0,00b	0,00b	33,33b	0,30d	1,22bc
2 mg/l IBA	0,00c	0,00b	0,00b	33,33b	0,38c	1,64a
4 mg/l IBA	55,55a	4,00a	0,32a	33,33b	0,90a	1,46ab
1 mg/l NAA	33,33b	6,00a	0,45a	55,55a	0,43bc	1,37ab
2 mg/l NAA	0,00c	0,00b	0,00b	33,33b	0,47b	0,95c
4 mg/l NAA	66,66a	4,00a	0,40	33,33b	0,32d	0,60d

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P≤0,05).

Kallus oranı 1 mg/l NAA, kallus büyüklüğü ise 4 mg/l IBA içeren ortamlarda yüksek olmuş, her iki özellik bakımından da büyüme düzenleyici x doz interaksiyonu istatistiksel olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün boyu bakımından da büyüme düzenleyici x doz interaksiyonu önemli çıkmış, 2 mg/l IBA dozu en fazla uzamayı oluşturmuş, 4 mg/l IBA ve 1 mg/l NAA içeren ortamlarla etkisi aynı olmuştur (Tablo 3.34).



(a) (b) (c)

Şekil 3.29. Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında IBA dozlarının köklenmeye etkisi, a) 1 mg/l IBA, b) 2 mg/l IBA, c) 4 mg/l IBA



(a) (b) (c)

Şekil 3.30. Yuvacık 4 genotipinde, WPM besin ortamında NAA dozlarının köklenmeye etkisi, a) 1 mg/l NAA, b) 2 mg/l NAA, c) 4 mg/l NAA

Tez çalışmasında Yuvacık 2 genotipinde IBA köklenmede etkili olurken, Yuvacık 4 genotipinde NAA da etkili bir oksin olarak görülmektedir. Bu durum genotiplere göre oksin isteğininin değişebileceğini göstermektedir.

3.6. Dış Koşullara Alıştırma (Adaptasyon) Aşaması Sonuçları

WPM ortamında çoğaltıldıktan sonra, yine WPM ortamında köklendirilen Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotiplerinin mikro bitkileri adaptasyon aşaması için dış koşullara alınmıştır. Her dozdan aktarılan bitki sayıları farklı olduğu için istatistik analizi yapılmamıştır.

3.6.1. Yuvacık 2 genotipinde dış koşullara alıştırma aşaması sonuçları

Bu genotipte, dış koşullara alıştırma safhasında en başarılı sonuçlar 1 mg/l IBA ve 1 mg/l NAA içeren ortamlarda köklenen mikro bitkilerden sağlanmıştır. En düşük yaşama oranı ise IBA ve NAA'nın 2 mg/l dozlarında köklenen mikro bitkilerde olmuştur (Tablo 3.35 ve Tablo 3.36). Genotipin fotoğrafları şekil 3.31 ve 3.32'dedir.

Tablo 3.35. Yuvacık 2 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı IBA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları

IBA (mg/l)	Toprağa alınan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşama oranı (%)
1	2	2	100
2	7	2	28,6
4	5	2	40,0
Toplam	14	6	42,9

Tablo 3.36. Yuvacık 2 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı NAA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları

NAA (mg/l)	Toprağa alınan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşama oranı (%)
1	5	2	40,0
2	7	2	28,6
4	3	1	33,3
Toplam	15	5	33,3

3.6.2. Yuvacık 4 genotipinde dış koşullara alıştırma aşaması sonuçları

Bu genotipte, en yüksek yaşama oranı 4 mg/l IBA içeren ortamlardan elde edilen mikro bitkilerde saptanmıştır (Tablo 3.37). NAA dozlarında 1 mg/l NAA en yüksek

yaşama oranına sahip olurken, 4 mg/l NAA ortamına dikimi yapılan mikro bitkilerin hiçbirinde adaptasyon gerçekleşmemiştir (Tablo 3.38). Genotipe ait fotoğraf şekil 3.33'te gösterilmiştir.

Tablo 3.37. Yuvacık 4 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı IBA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları

IBA (mg/l)	Toprağa Alınan Bitki Sayısı (adet)	Yaşayan Bitki Sayısı (adet)	Yaşama Oranı (%)
1	0	0	0
2	0	0	0
4	5	2	40,0
Toplam	5	2	-

Tablo 3.38. Yuvacık 4 genotipinde, dış koşullara alıştırma aşamasında farklı NAA dozlarında mikro bitkilerin yaşama oranları

NAA (mg/l)	Toprağa Alınan Bitki Sayısı (adet)	Yaşayan Bitki Sayısı (adet)	Yaşama Oranı (%)
1	3	1	33,3
2	0	0	0
4	6	0	0
Toplam	9	1	-

IBA ve NAA büyüme düzenleyicilerinde adaptasyon aşamasında Yuvacık 2 genotipi Yuvacık 4' e göre daha başarılı olmuştur. Köklendirme için IBA'nın kullanılması dış koşullara alıştırma aşamasında başarıyı arttırmıştır (Tablo 3.39).

Tablo 3.39. Dış koşullara alıştırma aşamasında Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotiplerinde yaşama oranları

Genotip Adı	Oksin Adı	Yaşama Oranı (%)	Genotip Ortalaması
Yuvacık 2	IBA	42,90	38,12
Yuvacık 2	NAA	33,33	
Yuvacık 4	IBA	40,00	25,56
Yuvacık 4	NAA	11,10	
Ortalama	IBA 41,45	NAA 22,22	-



(a) (b) (c)

Şekil 3.31. IBA eklenen WPM besin ortamında köklendirilen Yuvacık 2 genotipine ait mikro bitkilerin adaptasyon durumu, a) 1 mg/l IBA, b) 2 mg/l IBA, c) 4 mg/l IBA



(a) (b) (c)

Şekil 3.32. NAA eklenen WPM besin ortamında köklendirilen Yuvacık 2 genotipine ait mikro bitkilerin adaptasyon durumu, a) 1 mg/l NAA, b) 2 mg/l NAA, c) 4 mg/l NAA



(a) (b)

Şekil 3.33. Yuvacık 4 genotipinde mikro bitkilerin adaptasyon durumu, a) 4 mg/l IBA, b) 1 mg/l NAA

Çalışmalar esnasında eksplantlarda yoğun kararmalar gözlemlenmiş, kararmanın şiddetine göre eksplant ölümlerinde farklılıklar görülmüştür. Orta ve çok şiddetli kararmalarda eksplantta genellikle yaşamsal faaliyet sona ermiş, az şiddetli kararma görülen ya da kararma olmayan eksplantların yaşamsal faaliyetleri devam etmiştir. Kararmanın, eksplantların kesik uçlarından salınan fenolik bileşiklerin fenoloksidazlar, peroksidazlar ile ya da hava yoluyla oksidasyonu sonucu oluştuğu düşünülmekte ve bir çok türde karşımıza çıktığı görülmektedir (Ancora ve diğ., 1981; Bhat ve Chandel, 1991; Block ve Lankes, 1995; Josektty ve diğ., 2003; Puchooa, 2004; Teixeira ve diğ., 2006; Alp ve diğ., 2010). Eksplantın kesim yerlerinde kararmaların görülmesinde kocayemişin fenolik bileşiklerce zengin olmasının da etkisi olduğu tahmin edilmektedir.

Murashige (1974) doku kültürlerinde başarı oranının bir önceki aşama ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmasında da kültürlerde enfeksiyon, kararma, uç kuruması ve sürgünlerde erken yaşlanmaya bağlı yaprak dökülmeleri ile karşılaşılmış, genotiplere göre hassasiyet bakımından farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bunun sonucunda da bir önceki kültürde sorun yaşanan genotipe, ardından gelen aşamada yer verilememiştir. Gomes ve Canhato (2009) bu gibi durumların genotipler arasındaki farklılıktan ziyade, kültür koşulları ile alakalı olabileceğini, kültür koşullarının iyileştirilmesi/değiştirilmesi gerekliliğini önermişlerdir. Çalışılan beş genotipte değişik zamanlarda yapılan dikimlerde ortam bileşimi ve kültür koşulları aynı olsa bile, gerek materyal alım zamanının değişken olması, gerekse epikormik sürgün oluşumu şartlarının değişimi farklı sonuçların oluşmasına yol açması, bu görüşü destekler niteliktedir.

Çalışmada sitokinin olarak BAP yer almıştır. Kocayemiş kültürlerinde çoğaltma aşamasında kullanılan BAP'ın yüksek dozlarında daha kısa sürgünler oluşmaktadır. BAP dozu köklenme aşamasında bile sürgün boylanmasını etkilemektedir (Gomes ve diğ., 2010). Benzer şekilde istatistiksel olarak önem oluşturmasa da Yuvacık 2 ve Ereğli genotiplerinde alt kültürlerde ortamda BAP dozu arttıkça ana eksplantlarda ve yeni gelişen sürgünlerde uzama azalmış, Yuvacık 4 ve Ulaşlı 1 genotipinde ise artmıştır. MS ortamında çoğaltma aşamasında ise Yuvacık 2 ve Ulaşlı 1 genotiplerinde doz 6 mg/l'ye çıkmasına karşın sürgün boyunda etkilenme olmamış, WPM ortamında çoğaltılan sürgünlerde ise Yuvacık 2, Yuvacık 4 ve Ulaşlı 1

genotiplerinin hepsinde BAP dozunun 2 mg/l'den 4 mg/l'ye çıkarılması sürgün boyunda istatistiksel önem göstermeyen azalmaya neden olmuştur.

Çoğaltma aşamasında sitokinin çeşidi gelişimi önemli oranda etkilemektedir. *Arbutus* türlerinde BAP varlığında sürgün uzaması yetersiz kalırken, zeatin içeren ortamlarda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Mostafa ve diğ., 2010; Bertsouklis ve Papafotiou, 2011). Zeatin sürgün proliferasyonu için gerekli bir büyüme düzenleyicisi olarak ortaya konmuştur. Sitokinin çeşitleri üzerinde Gomes ve diğerleri (2010) tarafından kocayemiş bitkisinde çalışma yapılmıştır. Farklı sitokininler (2-ip, BA, kinetin, TDZ, zeatin) aynı dozda (8,9 µM) FS ortamında kullanılmıştır ve bu çalışmada en başarılı sonucu kinetin dozu vermiştir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda, kocayemişte gerek alt kültür gerekse sürgün çoğaltma aşamalarında hem MS hem de WPM besin ortamlarında eksplant başına sürgün verimi düşüktür. Kocayemişte önceki yürütülen çalışmalarda da mevsimlere göre değişkenlik, kontaminasyon ve düşük proliferasyon oranları öne çıkan problemler olarak belirtilmiştir. Kocayemişte düşük oranda proliferasyon olması sorununa dünyada birçok araştırıcı yayınlarında vurgu yapmış ve bu durumu ifade etmiştir. (Mereti ve diğ., 2002; Bertsouklis ve Papafotiou, 2009; Gomes and Canhoto, 2009; El Sayed El Mahrouk ve diğ., 2010; Papafotiou ve diğ., 2013). Papafotiou ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmada MS besin ortamı WPM ortamına göre sürgün proliferasyonunda öne çıkmıştır. *Arbutus unedo*'da sürgün sayısı 3,4 adet olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlardan oldukça yüksektir.

Çalışmamızda MS ve WPM besin ortamlarının her ikisi de birbirine yakın değerler oluşturmuş, genotiplere bağlı olarak etki yapmıştır. Papafotiou ve diğerleri tarafından 2013 yılında aynı zeatin dozları uygulanan MS ve WPM ortamlarında *Arbutus unedo, Arbutus andrachne* ve bunların doğal melezi olan *Arbutus andrachnoides*'in doku kültürü performanslarını değerlendirmiş, çalışma neticesinde her 3 tür için 2,5 mg/l zeatin içeren MS ortamının WPM ortamına göre daha yüksek sürgün çoğaltma için uygun olduğu, 1 mg/l IBA içeren WPM ortamının ise köklendirmede MS besin ortamına göre daha elverişli olduğu belirtilmiştir. Kocayemişte mikro çoğaltma

çalışmalarında farklı besin ortamlarının denenmesi ve farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının uygulanması yapılacak çalışmalara zenginlik katacaktır.

NAA'nın kallusu arttırıcı etkisi kocayemiş genotipleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ifade edilmiş ve ortamda organize olmamış yapıların çoğaldığı belirtilmiştir (Gomes ve diğ., 2010). Yuvacık 4 genotipinde köklenme üzerine NAA' da etkili olurken, IBA'nın kallus oluşumunda etkili olması bize, oksin çeşidi ve dozları ile ilgili çalışmaların genotiplere göre çeşitlendirilmesi gereğini düşündürmüştür. Mostafa ve diğerleri (2010) *Arbutus andrachne*'de mikro sürgünlerin köklenmesinde en başarılı sonuçları 1 mg/l NAA içeren ortamda elde etmiştir. Sonuçlar Yuvacık 4 genotipi ile benzerdir.

Doku kültürü çalışmamızda farklı lokasyondan seçilen genotiplerde, hatta aynı lokasyondan seçilen genotipler arasında bile önemli farklılıklar oluşmuştur. Aynı lokasyonda bulunan Yuvacık grubu genotiplerde farklı büyüme düzenleyiciler ve farklı dozlarda en ideal sürgün ve kök gelişimi gözlemlenmiştir. Pipinis ve diğerleri tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada; kocayemiş tohumlarının toplandıkları bölgelere göre çimlenme sonuçları önemli değişim göstermiştir. Bu durumun kocayemişteki genetik çeşitliliği ortaya koyduğu ifade edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yüksek lisans çalışmasında, kocayemiş genotiplerinin (Ereğli, Ulaşlı 1, Yuvacık 2, Yuvacık 3 ve Yuvacık 4) in vitro çoğaltma olanakları incelenmiştir. Çalışmanın tasarlanması aşamasında; *Arbutus* türlerinin bitki doku kültürü teknikleri ile üretilmesi ile ilgili literatür araştırması yapılmıştır. *Arbutus unedo* bitkisinin in vitro üretimi için en ideal besin ortamları ve bu ortamlara ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün oluşumu ve gelişimine etkileri ile köklenme ve kök oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kocayemiş tiplerinin ortam ve büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarına tepkileri ölçülmüştür. Ayrıca sterilizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek en uygun sterilizasyon tekniği ve süresi bulunması hedeflenmiştir.

Kocayemiş sürgün ucu ve boğum eksplantlarının sterilizasyonuna yönelik çalışmalar neticesinde hem sürgün ucu eksplantlarında hem de boğumlu eksplantlarda; eksplantların %50 etil alkol ile 1 dakika muamele + %20 sodyum hipoklorit ile 12 dakika muamele edildiği D tekniği; yaşama oranları, enfeksiyon ve kararma oranlarına göre en iyi sterilizasyon tekniği olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3). Çalışmamızda sterilizasyon tekniğine bakılmaksızın eksplantların kültürlerde yaşama oranı değerlendirildiğinde sürgün ucu eksplantlarının yaşama oranı daha yüksek olmuştur. Boğumlu (nod) eksplantların yaşama oranı %56,87 olarak gerçekleşirken, sürgün ucu eksplantlarında ise bu oran %61,58 olmuştur. Sonuçlar, sürgün ucu eksplantlarının yaşama oranlarının (%38,65) boğumlu eksplantlara (%4,49) göre daha yüksek olduğunun belirtildiği çalışma sonuçları ile benzerdir (Gomes ve Canhato 2009).

Kararmanın önüne geçebilmek amacıyla *Arbutus unedo*'nun yetişkin ağaçlarından alınan yarı odunsu boğumlu eksplantların 10 dakika süre ile antioksidan solüsyonuna (150 mg/l askorbik asit + 100 mg/l sitrik asit + 1 g/l aktif kömür) batırılması kültürler sırasında oluşan kararma sorununu tamamen ortadan kaldırmıştır (El-Sayed El-Mahrouk ve diğ., 2010). Doku kültürü çalışmalarında antioksidant kullanılarak ortamlarda oluşabilecek enfeksiyon ve kararmaları önlemek mümkündür. Besin

ortamına sitrik asit, askorbik asit, thiourea veya L-sistin gibi antioksidanların ilave edilmesi ile fenollerin oksidasyonu önlebilmektedir (Hatipoğlu, 2008). Diğer bir çalışmada fenolik oksidasyonu engellemek için eksplantlar 1 hafta süresince, 25±1 ºC'de karanlık şartlarda bekletildikten sonra 16 saatlik periyotta ışıklanma süresi olan büyüme odasına transfer edilmiştir. Bu şekilde işleme tabi tutulan eksplantlarda kararma daha az görülmüştür (Gomes ve diğ., 2009). Bazı bitki eksplantlarının yara yerlerinden salgıladıkları kahverengi/siyah pigmentlerin zararlı etkilerinin önlenmesi için glutamin, arginin ve asparagin amino asitleri besin ortamına ilave edilmektedir. Ayrıca eksplantlarda mümkün olduğunca az yara yeri oluşturulması ile yara yerlerinden çıkan salgıların azaltılmasının mümkün olabileceği, eksplantların kültür ortamına konulmadan önce steril suya batırılması ile yara yerlerinden çıkan salgının azaltılabileceği belirtilmektedir. (Hatipoğlu, 2008). Söz konusu olan bu çalışmalarda kullanılan yöntemler tez çalışmamızda da yoğun kararma görülen genotiplerde denenebilecek uygulamalardır. Bu uygulamaların denenmesi ile kararmanın önüne geçilmesi hususunda fayda sağlanacağı ön görülmektedir.

Tez çalışmasında alt kültür aşamasında temel besin ortamı olarak MS (Murashige & Skoog) ortamı kullanılmış, BAP (6-Benzil amino purin) dozlarının eksplantlar üzerindeki etkileri ölçülmüştür. Yuvacık 2 genotipinde alt kültür çalışmalarında tüm dozlarda ana eksplant uzaması görülmüş, en fazla uzama 0 mg/l BAP + 0,1 GA_3 ve 2 mg/l BAP + 0,1 GA_3'te gerçekleşmiştir. Tek başına GA_3 hücre uzamasında etkisini göstererek eksplantların uzamasını sağlamıştır. Alt kültürlerin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, proliferasyon oranı ve sürgün verimi bakımından Yuvacık 2, Yuvacık 4 ve Ereğli genotipleri için 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 dozunun, Ulaşlı 1 genotipi için 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 dozunun öne çıkan dozlar oldukları görülmektedir.

WPM besin ortamında yapılan sürgün çoğaltma çalışmalarında 0,1 GA_3 sabit olmak şartı ile farklı BAP dozları kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde Yuvacık 2 ve Ulaşlı 1 genotiplerinde sürgün çoğaltma aşamasında en iyi sonuçlar 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 kombinasyonundan (sırasıyla 1,33 adet ve 1,75 cm; 1,33 adet ve 1,38 cm), Yuvacık 4 genotipinde ise 0 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3 kombinasyonundan (1 adet ve 1,10 cm) alınmıştır. Yapılan bir başka çalışmada, sürgün çoğaltmada WPM besin ortamında farklı BA dozları (0-1,25-2,5-5 mg/l) kullanılmış, en uzun

sürgün boyu 1,25 mg/l BA dozunda 1,06 cm olarak ölçülmüştür. En iyi sürgün verimi ise 5 mg/l BA dozunda 1 cm'den küçük eksplant sayısı eksplant başına 2,3 adet olarak, 1 cm'den büyük eksplant ise eksplant başına 1,40 adet olarak tespit edilmiştir (Mereti ve diğ., 2002). Sonuçlar, özellikle 1 cm'den uzun sürgün gelişimi değerlendirildiğinde çalışmamızdaki sonuçlara yakındır.

Köklendirme çalışması için WPM besin ortamında birbirinden bağımsız olarak farklı IBA dozları ile farklı NAA dozları kullanılmıştır. Çalışmada Yuvacık 2 ve Yuvacık 4 genotiplerinde değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu köklendirme çalışmasında Yuvacık 2 genotipinde IBA ve NAA'nın tüm dozlarında köklenme olmuştur. IBA dozlarının NAA dozlarına göre köklenmede üstünlüğü söz konusudur. En uzun kökler 2 mg/l IBA dozunda olmuştur (Tablo 3.31). Yuvacık 2 genotipinde kök sayısı 2 mg/l IBA ve 4 mg/l IBA dozlarında diğer dozlara göre önemli miktarda daha yüksek meydana gelmiştir (Sırasıyla 6,25 adet ve 6 adet). Ayrıca diğer köklenme ile ilgili parametreler kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından da IBA genel olarak NAA'ya göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Yuvacık 2 genotipi için, 2 mg/l IBA dozu köklenmede en uygun doz olarak belirlenmiştir. Literatürlerde de *Arbutus unedo* için WPM besin ortamında en iyi köklenme oranının 2 mg/l IBA'da oluştuğu belirtilmiştir (Mereti ve diğ., 2002; Papafotiou ve diğ., 2013).

Yuvacık 4 genotipinde köklenme oranı 4 mg/l IBA'da ve 4 mg/l NAA'da diğer dozlara göre istatistiksel açıdan önemli bir artış göstermiştir. En çok kök sayısı 6 adet olarak 1 mg/l NAA içeren ortamda olmuştur. Ancak istatistiksel olarak 4 mg/l IBA ve 4 mg/l NAA (her ikisinde de 4 kök) içeren ortamlarla aynı grupta yer almıştır (Tablo 3.34). Bu genotipte 4 mg/l IBA veya 4 mg/l NAA dozları köklenme için denenen en yüksek dozlardır. Bu genotipte ileride yapılacak köklenme çalışmalarında IBA ve/veya NAA'nın sözkonusu dozun üstü dozları denemelerde kullanılabilecek uygulamalardır.

Kallus oluşumunda Yuvacık 2 genotipinde 1 mg/l IBA içeren ortamdaki sürgünlerde %77,7 oranı ile en yüksek oran ölçülmüştür. Bu genotipte NAA'da IBA'ya göre kallus oranı artmıştır. NAA dozu arttıkça kallus oranında artış gözlemlenmiştir. Yuvacık 4 genotipinde en yüksek kallus oranı 1 mg/l NAA'da gözlemlenmiş olup, kallus büyüklüğü ise 4 mg/l IBA'da en yüksek olmuştur.

İklime alıştırma çalışmalarında IBA dozlarını içeren ortamda köklendirilen bitkilerin adaptasyonu, NAA ile köklendirilen bitkilerden daha yüksek oranda gerçekleşmiştir. Ancak adaptasyon çalışmalarında yaşama oranları ortalaması IBA dozunda ve NAA dozunda istenilen oranda gerçekleşmemiştir. En yüksek yaşama oranı ortalaması Yuvacık 2 genotipinin IBA dozunun ortalamasında %42,9 olarak gerçekleşmiştir. Mereti ve diğerleri (2002) tarafından kocayemişte IBA veya IAA içeren ortamlarda köklendirilen kocayemiş sürgünlerinde IBA ortamlarında daha yüksek köklenme oranları elde edilmiş, ancak elde edilen mikro bitkiciklerin adaptasyon aşamasındaki yaşama oranları %22-55 gibi düşük olmuştur. Aynı çalışmada, 10 µM IAA içeren köklenme ortamına (1:4 v/v) torf:perlit karışımı ilave edilmesi ile bol saçak köklü bitki oranı artmış ve bu bitkiler adaptasyon aşamasında başarılı sonuçlar vermiştir. Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda farklı karışımlarda köklenme çalışmalarının yapılması kök sayısı ve kalitesini artırma bakımından göz önünde bulundurulmalıdır.

Yetişkin kocayemiş eksplantlarından alınan sürgünlerle oluşturulan doku kültürlerinde daha yüksek oranda kontaminasyon oluşmaktadır. Ayrıca vejetasyon süresi kültüre alma zamanını kısıtlamaktadır. Eksplantların gençleştirilmesi doku kültürü çalışmasında sıklıkla başvurulan bir uygulamadır. Gomes ve Canhato (2009) ormanlık sahada yangın sonrasında yeniden süren 2-3 aylık genç sürgünleri ve doğadaki kocayemiş bitkilerinden topladıkları kalın odun dallarından sürdürdükleri taze epikormik sürgünleri kültüre almışlardır. Tez çalışmamızda genç epikormik sürgünlerden kültürler oluşturulmuş, ancak başarı oranı beklenen düzeye ulaşmamıştır. Yetişkin bitkilerden alınacak sürgün uçları ile başarı ölçütünün ne olacağı denenebilecek bir uygulamadır.

Sağlık açısından yararları belirtilen ve dünyada giderek önemi artan türler içinde yer alan kocayemişin, ülkemizde de hak ettiği değeri görebilmesi için doğada seleksiyonu yapılan ve yapılacak olan üstün özellikli tiplerinin kültüre alınıp değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylece, ülke meyveciliğine, gıda endüstrisi başta olmak üzere diğer endüstri alanlarına ve önümüzdeki yıllarda önemi giderek artacak olan alternatif meyveler pazarında söz sahibi olmada fayda sağlanacağı öngörülen bir gerçektir. Kocayemişin doku kültürü ile çoğaltılması konusunda protokollerin geliştirilmesi, yapılacak çalışmalara ışık tutmak, bu çalışmanın önemli hedefleri

arasında yer almaktadır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların ülkemizde yapılacak olan kocayemiş ve bağlı bulunduğu fundagiller familyasının doku kültürü ile çoğaltılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Alp H. A., Düzyaman E., Özzambak E., İn vitro'da Kültüre Alınan Sürgün Uçlarında Sağlıklı Gelişim Oranını Arttırma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 2010, **47**(2),113-122.

Ancora G. M., Belli-Donni, Couzzo L., Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid in vitro micropropagation, *Scientia Horticulture*, 1981, **14,** 207-213.

Anşin R., Özkan C., Tohumlu Bitkiler, *K.T.Ü. Orman Fak. Genel Yayın,* 1993, **167**(19), 512.

Ayaz F. A., Küçükislamoğlu M., Reunanen M., *Journal of Food Composition and Analiysis*, 2000, **13,** 171-177.

Bertsouklis K. F., Papafotiou M., In vitro propagation of *Arbutus andrachne* L., *Acta Hortic*., 2009, **813**, 477-480.

Bertsouklis K. F., Papafotiou M., Effect of various cytokines on micropropagation of *Arbutus x andrachnoides* Link, *Acta Horticulturae*, 2011, **923**, 213-218.

Bertsouklis K. F., Papafotiou M., Seed Germination of *Arbutus unedo, A. andrachne* and Their Natural Hybrid *A. andrachnoides* in Relation to Temperature and Period of Storage, *HortScience*, 2013, **48**(3), 347-351.

Bhat R. S., Chandel K. P. S., A novel technique to overcome browning in tissue culture, *Plant Cell Reports*, 1991, **10**, 358-361.

Block R., Lankes C., Reasons for tissue browning of explants of the apple root stock M9 during in vitro establishment, *Gartenbauwissenschaft*, 1995, **60,** 276-279.

Cavusoglu A., Sulusoglu M., Erkal S., Biotechnological approaches in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) breeding, *Journal of Crop Breeding and Genetics*, 2015, **1**(1), 36-41.

Çelikel G., Sinop İli ve Samsun'un Yakakent İlçesinde Kocayemiş (*Arbutus unedo* L. – *Ericaceae*) Seleksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 2005, 185690.

Davis P.H., Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburg Üniv.*, 1978, **6,** 99-100.

El-Sayed El Mahrouk M., Dewir Y. H., Omar A. M. K., In Vitro Propagation of Adult Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Through Adventitious Shoots and Somatic Embryogenesis, *Propagation of Ornamental Plants*, 2010, **10**(2), 93-98.

Ertekin M., Kırdar E., Breaking Seed Dormancy of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*), *International Journal Of Agriculture & Biology*, 2010, **12**(1), 57-60.

Ersoy S. V., Karasu (Sakarya) ve Çevresinde Yetişen Kocayemiş Genotiplerinin Seleksiyon Yoluyla Islahı, Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu, 2017, 479192.

Fidancı A., Kocayemiş'in (*Arbutus unedo* L.) Doku Kültürü İle Üretimi, *VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Çanakkale, Türkiye, 25-29 Ağustos 2015.

Gerçekcioğlu R., Bilgener Ş., Soylu A., *Genel Meyvecilik (Meyve Yetiştiriciliğinin Esasları)*, 4. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. Göktuğ Ofset Matbaacılık, Ankara, 2014.

Giordani E., Benelli C., Perria R., Bellini E., In vitro germination of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) genotypes:establishment, proliferation, rooting and callus induction, *Adv. Hort. Sci.*, 2005, **19**(4), 216-220.

Gomes F., Canhoto J. M., Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants, *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*, 2009, **45,** 72-82.

Gomes F., Simões M., Lopes M. L., Canhoto J. M., Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree), *New Biotechnology*, 2010, **27**(6), 882-892.

Güleryüz M., Parlak L., Aslantaş R., Bazı Yabani Meyve Türlerinin Besin Değerlerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma., *Türkiye II. Bahçe Bitkileri Kongresi*, Adana, 3-6 Ekim 1995.

Günaydın B., *Arbutus unedo* L. nin in vitro kültürlerle klonal çoğaltımının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2005, 169520.

Hammami I., Jellali M., Ksontini M., Rejeb M. N., Propagation of the Strawberry Tree Through Seed (*Arbutus unedo*), *International Journal of Agriculture & Biology*, 2005, **7**(3), 457-459.

Hatipoğlu R., *Bitki Biyoteknolojisi*, 7. Baskı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana, 2008.

İslam A., Pehlivan N. F., Marmara adasında yetişen kocayemişlerin (*Arbutus unedo* L.) pomolojik özellikleri, *Akademik Ziraat Dergisi*, 2016, **5**(1), 13-20.

Josekutty P.C., Cornelius S.S., Kilafwasru T.N., Micropropagation of four banana cultivars in micronesia, *Micronesica Supplement*, 2003, **7**, 77-81.

Karadeniz T., Kurt H., Kalkışım Ö., Yomra (Trabzon) Çevresinde Yetişen Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) Tiplerinin Meyve Özellikleri Üzerinde Çalışmalar, *Y.Y.Ü.Z.F. Dergisi*, 1996, **6**(4), 65-70.

Karadeniz T., Şişman T., Giresun'da Yetiştirilen Bir Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) Tipinin Biyolojik Özellikler, *Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Ordu, 23-25 Ekim 2003.

Kıvçak B., Mert T., Quantititative determination of α-tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry, *Fitoterapi*, 2001, **72**, 656-661.

Kıvçak B., Mert T., Demirci B., Composition of the essential oil of *Arbutus unedo, Chemistry of Natural Compounds,* 2001, **37**(5), 445-446.

Köse, H., Studies on the germination of some woody ornamental plants in the Turkish flora, 1. *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachne* L. *Anadolu*, 1998, **8**(2), 55-65.

Lloyd G.B., McCown B. H., Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shhot-tip culture, *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 1981, **30**, 421-427.

Mereti M., Grigoriadou K., Nanos G. D., Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L., *Scientia Horticulturae*, 2002, **93**, 143-148.

Metaxas D. J., Syros T. D., Yupsanis T., Economou A. S., Peroxidases during adventitious rooting in cutting of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment, *Plant Growth Regulation*, 2004, **44**, 257-266.

Morini S. ve Fiaschi G., In vitro Propagation of strawberry tree, *Agricoltura Mediterranea*, 2000, **130**, 240-246.

Mostafa S. E., Karam N. S., Shibli R. A., Alali F. Q., Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.), *Plant Cell Tissuse and Organ Culture*, 2010, **103**, 111-121.

Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures, *Physiol. Plant*, 1962, **15**, 473-497.

Murashige T., Plant propagation through tissue culture, *Ann. Rev. Plant Physiol*, 1974, **25**, 135-166.

Onursal C. E. ve Gözlekçi Ş., Sandal Ağacı (*Arbutus andrachne* L.) tohumlarına yapılan bazı ön uyugulamaların tohum çimlenme oranı ve süresi üzerine etkileri, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 2007, **20**(2), 211-218.

Ötleş S., Kocayemiş (dağ çileği) bileşimi ve insan sağlığına etkisi, Dünya Gıda Dergisi, http://dunyagida.com.tr/kose-yazisi/kocayemis-dag-cilegi-bilesimi-ve-insan-sagligina-etkisi/1193 (Ziyaret tarihi : 23.12.2017).

Pabuçcuoğlu A., Kıvçak B., Baş M., Mert T., Antioxidant Activity of *Arbutus unedo* leaves, *Fitoterapia*, 2003, **74**(6), 597-599.

Papafotiou M., Bertsouklis K. F., Trigka M., Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid, *A. x andrachnoides* from seeedling explants, *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2013, **88**(6), 768-775.

Pekdemir M., Espiye ve Bulancak İlçelerinde (Giresun) Yetişen Kocayemişlerin Fenolojik ve Pomolojik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, 2010, 329444.

Pignatti G., Crobeddu S., Effects of rejuvenation on cutting propagation of Mediterranean shrub species, *Forest*, 2005, **2,** 290-295.

Pipinis E., Stampoulidis A., Milios E., Kitikidou K., Radoglou K., Effects of cold stratification and GA_3 on germination of *Arbutus unedo* seeds of three provenances, *Afr. J. Tradit Complement Altern Med*., 2017, **14**(1), 318-323.

Puchooa D., In vitro regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn), *African Journal of Biotechnology*, 2004, **3**(11), 576-584.

Sakaldaş A., Çanakkale Doğal Florasında Bulunan Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.)'in Fenolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Aylık Değişimlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 2012, 309571.

Sulusoglu M., Cavusoglu A., Erkal S., *Arbutus unedo* L. (Strawbery tree) selection in Turkey Samanli mountain locations, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, **5**(15), 3545-3551.

Sulusoglu M., Development of a Rooted Cutting Propagation Method for Selected *Arbutus unedo* L. Types and Seasonal Variation in Rooting Capacity, *Journal of Agricultural Science*, 2012, **4**(11), 216-225.

Şeker M., Akçal A., Sakaldaş M., Gündoğdu M. A., Farklı Çelik Dönemleri İle Oksin Dozlarının Kocayemişin (*Arbutus unedo* L.) Köklenme Oranı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, **24**(1), 99-108.

Şeker M., Yücel Z., Nurdan E., Çanakkale Yöresi Doğal Florasında Bulunan Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) Populasyonunun Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 2004, **10**(4), 422-427.

Teixeira S.L., Riberio J.M, Teixeira M.T., Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, **86,** 375-378.

Tilki F., Improvement in Seed Germination of *Arbutus unedo* L., *Pakistan Journal of Biological Science*, 2004, **7**(10), 1640-1642.

Tutin T. G., Heywood V.H., Valentine D.H., Walters S.W., Webb D.A., Flora Europaea, *Cambridge University*, 1981, **3,** 118.

URL-1: http://underutilized-species.org/species/about_species.html (Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2017).

URL-2: https://ec.europa.eu/agriculture/cap-funding_en (Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2017)

URL-3: https://www.gbif.org/species/2882803 (Ziyaret tarihi: 05 Ocak 2018).

URL-4: http://www3.unifi.it/ ueresgen29/ds9.htm (Ziyaret tarihi: 04 Nisan 2018).

URL-5: https://Floridata.com/ref/A/arbu_une.cfm, (Ziyaret tarihi: 3 Temmuz 2018).

Varol Ö., Flora of Başkonuş Mountain (Kahramanmaraş), *Türk J.B.*, 2003, **27**, 117-139.

Yarılgaç T., İslam A., Ünye yöresi kocayemişlerinin (*Arbutus unedo* L.) bazı pomolojik özellikleri, *Türkiye 5. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Erzurum, 4-7 Eylül 2007.

Zenginbal H., Gündoğdu M., Düzce ve Zonguldak İllerinde doğal olarak yetişen kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) genotiplerinin fizikokimyasal karakterizasyonu, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 2016, **31**(3), 332-336.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Sulusoglu Durul M., Aydın Can B., **Memiş S.**, Fruit Growing in East Marmara Region of Turkey: Kocaeli Sample From Past to Future, *VII International Scientific Agriculture Symposium Agrosym 2016*, Jahorina, Bosnia Herzegovina, 06-09 October 2016.

Efe İ., **Memiş S.**, Sulusoglu Durul M., The Analysis of Quince Production and Research in Turkey : Opportinities, Obstacles and Suggesstions with Kocaeli sample, *2nd International Balkan Agriculture Congress*, Tekirdag, Turkey, 16-18 May 2017.

ÖZGEÇMİŞ

1977'de Kocaeli'nde doğdu. İlkokulu Kandıra'nın Kaymaz (Araman) Köyü'nde, orta ve lise öğrenimini Sakarya'da (Adapazarı) tamamladı. 1994 Yılında girdiği Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden 1998 yılında ziraat mühendisi olarak mezun oldu. Özel sektörde ziraat mühendisi olarak 6 yıl çalıştıktan sonra Kocaeli İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nde 13 yıldır mühendis olarak görevine devam etmektedir.