T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTEPFISTIĞI MELEZ GENOTİPLERİNİN EMBRİYO KÜLTÜRÜ İLE ÇİMLENDİRİLMESİ VE GELİŞEN BİTKİLERİN GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

Mehmet Ali YAVUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Temmuz - 2019

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Mehmet Ali YAVUZ tarafından yapılan "Antepfıstığı melez genotiplerin embriyo kültürü ile çimlendirilmesi ve gelişen bitkilerin genetik kararlılığının belirlenmesi"konulu bu çalışma , jürimiz tarafından BiyolojiAnabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç.Dr.Filiz AKBAŞ

Üye : Doç.Dr.Çiğdem IŞIKALAN

Üye: Prof.Dr.Ahmet ONAY (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: **12/07/2019**

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında gerek laboratuvarda gerek programların öğretilmesinde dahiyane fikirleriyle bana yol gösteren analitik düşüncemi sağlayan pratik yapma konusunda yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ahmet ONAY'a,

Tezimin moleküler kısmını çalışan GYTE-MBG da görevli Dr.Hülya AKDEMİR'e. sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda uygulamalarda bana yardımcı olan Arş. Gör. Hilal SURMUŞ ASAN'a ve kız kardeşim Zehra YAVUZ'a,

Sonuçların istatistik aşamasını tamamlayan doktora öğrencisi Fatih Mehmet KILINÇ'a,

Bugüne kadar beni bu seviyeye taşıyan maddi manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli anneme ve babama,

Son iki yıldır hayatıma giren manevi desteklerini esirgemen kıymetli eşim Gamze ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma;

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından Fen 17.006 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Mehmet Ali YAVUZ

Temmuz 2019 - DİYARBAKIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……..…… I

İÇİNDEKİLER……..... II

ÖZET……..... V

ABSTRACT……..... VII

ÇİZELGE LİSTESİ……..... IX

ŞEKİL LİSTESİ……..…….. XI

KISALTMA VE SİMGELER……..…….…….. XII

1. GİRİŞ……...……..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 3

2.1. Embriyo Kültürünün Kullanım Alanları 4

2.2. Embriyo Kültürü Teknikleri 5

3. MATERYAL VE METOT..... 7

3.1. Materyal 7

3.1.1. Çalışma Materyalinin Temini 7

3.1.2. Besi Ortamının Hazırlanması, Yüzey Sterilizasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar 7

3.2. Metot..... 12

3.2.1. BBD'lerin ve Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu..... 12

3.2.2. Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu 13

3.2.3. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu 13

3.2.4. Çalışma Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu 13

3.2.5. Yüzey Sterilizasyonu Teknikleri 13

3.2.6. Büyüme Odası Koşulları 14

3.2.7. Besi Ortamlarının İçeriği 14

3.2.8. Embriyo Kültürü Çalışmaları 14

3.2.8.1. Besi Ortamı Tipinin İzole Edilmiş Pistacia Melez Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi 14

3.2.8.2. MS Besi Ortamı Kuvvetinin İzole Edilmiş Melez Pistacia Genotipi Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri 15

3.2.8.3. Karbonhidrat Çeşidinin İzole Edilmiş Melez *Pistacia* Genotipi Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi 15

3.2.8.4. BBD'lerinin Melez Pistacia Genotiplerinin İzole Edilmiş Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri 15

3.2.9. Kültür Odası Koşulları 15

3.2.10. Adaptasyon..... 16

3.2.11. İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi) 16

3.3. *P. vera* L. Klonlarının Genetik Analizleri 16

3.3.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu 16

3.3.2. ISSR Analizleri 17

3.3.3 IRAP Analizleri 18

3.3.4. İstatistiksel Analiz 18

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 19

4.1. Dört farklı *P. vera* L. Melez Genotipinin Yüzey Sterilizasyonu 19

4.2. Besi Ortamı Tipinin İzole Edilmiş Pistacia Melez Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi 20

4.3. MS Besi Ortamı Kuvvetinin İzole Edilmiş Melez Pistacia Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri 22

4.4. Karbonhidrat Çeşidinin İzole Edilmiş Melez *Pistacia* Genotipi Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi 26

4.5. BBD'lerinin Melez Pistacia Genotiplerinin İzole Edilmiş Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri 27

4.6. *Pistacia vera* L. *X Pistacia atlantica* L. hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi 32

4.7. *Pistacia vera* L. *X Pistacia terebinthus* L. hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi……... 37

4.8. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü) hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi 43

4.9. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (serbest) hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi…… 48

4.10 Köklenen Sürgünlerin Dış ortama Adaptasyonu Çalışmaları……. 55

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **57**

6. KAYNAKLAR..... **59**

ÖZGEÇMİŞ..... 63

ÖZET

ANTEPFISTIĞI MELEZ GENOTİPLERİNİN EMBRİYO KÜLTÜRÜ İLE ÇİMLENDİRİLMESİ VE GELİŞEN BİTKİLERİN GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Ali YAVUZ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Bu çalışmada Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü deneme alanında bulunan *Pistacia vera* L., *Pistacia atlantica* L., *Pistacia terebinthus* L. Defs. türlerinin açık ve kontrollü tozlaştırılması ile 4 çeşit melez genotip tohumu üretilmiştir: *Pistacia vera* L. x *Pistacia* vera L. (serbest tozlaşan), *Pistacia vera* L. x *Pistacia vera* L. (kontrollü tozlaşan), *Pistacia vera* L. x *Pistacia atlantica* L. *Pistacia vera* L. x *Pistacia terebinthus* L. Defs. Melez tohum embriyolarının in vitro ortamda maksimum düzeyde çimlendirilmesi için besi ortamı tipi, en iyi besi ortamının farklı kuvvetleri, bitki büyüme düzenleyicileri (BA, Kin, NAA ve IBA) ve sukroz ve glikoz gibi karbonhidratların etkileri çalışıldı.

Besi ortamı tipi çalışmalarında *P.vera* x *P.vera* (kontrollü) hibrit embriyolarının MS besi ortamında % 100 olarak çimlendiği ve yaprak sayısının fazla olduğu rapor edildi. Kök uzunluğu ve sürgün uzunluğu bakımında SH besi ortamındaki embriyoların daha iyi geliştiği gözlenmiştir. Sukroz ile destekli MS besi ortamında 4 melez genotipden [*P. vera* x *P. vera* (serbest tozlaşma)' , *P. vera* x *P. vera* (kontrollü), *P. vera* x *P. terebinthus ve P. vera* x *P. atlantica*] sırasıyla %80, %80, %80 ve %78 çimlenme oranları rapor edilmiştir. MS besi ortamı kuvvetinin melez embriyo çimlenmesine etkisinin çalışıldığı deneyde ise, tam kuvvetteki MS ortamında tüm genotiplerde yüksek çimlenme oranları elde edilmiştir. Melez embriyo çimlenmesine bitki büyüme düzenleyici (BA, Kin, NAA ve IBA) etkilerinin incelendiğinde deneyde ise, en yüksek çimlenme oranı (% 98.66) *P.vera* x *P.vera* (kontrollü) melez genotipinde elde edilmiştir.

Aklimitasyon çalışmalarında *in vitro* ortamda embriyolardan gelişen bitkicikler plastik kaplar içindeki steril 1:1:1 torf, toprak ve perlit karışımına iyi adapte olduğu görülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamında çimlendirilen melez genotiplerin genetik kararlılıkları IRAP ve ISSR moleküler belirteçleri ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia*, BBD, Melez, IRAP, ISSR

ABSTRACT

GERMINATION OF HYBRID *Pistacia* GENOTYPES VIA EMBRIO CULTURE AND DETERMINATION OF GENETIC STABILITY OF DEVELOPING PLANTS

MSc THESIS

Mehmet Ali YAVUZ

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2019

In this study, four (4) types of hybrid genotype seeds were produced by open and controlled pollination of the Pistacia species such as *Pistacia vera* L., *Pistacia atlantica* L., *Pistacia terebinthus* L. Defs.: *Pistacia vera* L. x *Pistacia vera* L. (free pollinated), *Pistacia vera* L. x *Pistacia vera* L. (controlled pollinated), *Pistacia vera* L. x *Pistacia atlantica* L. *Pistacia vera* L. x *Pistacia terebinthus* L. Defs. The effects of type of medium, different strengths of the best medium, plant growth regulators (BA, Kin, NAA and IBA) and carbohydrates such as sucrose and glucose were studied in order to maximize germination of isolated-hybrid seed embryos in vitro.

It was reported that *P. vera* x *P. vera* (controlled) hybrid embryos germinated in MS medium 100% and the number of leaves was high. In terms of root length and shoot length, it was observed that embryos developed better in SH medium. Germination rates in sucrose-supported MS medium from 4 hybrid genotypes [*P. vera* x *P. vera* (free pollination), *P. vera* x *P. vera* (controlled), *P. vera* x *P. terebinthus* and *P. vera* x *P. atlantica*] were reported 80%, 80%, 80% and 78%, respectively. In the experiment where the effect of MS medium strength on hybrid embryo germination was studied, high germination rates were obtained in all genotypes in full strength MS medium. The highest germination rate (98.66%) was obtained in *P.vera* x *P.vera* (controlled) hybrid genotype when the effects of plant growth regulator (BA, Kin, NAA and IBA) on hybrid embryo germination were examined,

Acclimation studies showed that in vitro plants grown from embryos were well adapted to sterile 1: 1: 1 mixture of peat, soil and perlite in plastic containers. Genetic stability of hybrid genotypes germinated in MS medium containing plant growth regulator was determined by IRAP and ISSR molecular markers.

Keywords: Pistacia, BBD, Hybrid, IRAP, ISSR

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 3.1.	Besi ortamlarının hazırlanmasında, somaklonal varyasyon belirlenmesinde ve yüzey sterilizasyonunda kullanılacak kimyasallar	8
Çizelge 3.2.	Çalışmalarda kullanılan besi ortamı içerikleri	9
Çizelge 3.3.	Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarına ilave edilen BBD'ler	9
Çizelge 3.4.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar	10
Çizelge 3.5.	gDNA izolasyonu ve miktar tayininde kullanılan kimyasallar	11
Çizelge 3.6.	PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar	12
Çizelge 4.1.	Dört farklı melez genotipin yüzey sterilizasyonu ve embriyolarının *in vitro* ortamına etkisi	19
Çizelge 4.2.	Besi ortamı tipinin melez embriyolarının *in vitro* çimlenmesine etkisi	20
Çizelge 4.3.	Zigotik embriyoların çimlenme ve gelişmesine MS besi ortamının kuvvetinin etkisi*	23
Çizelge 4.4.	Karbonhidrat çeşidinin izole edilmiş Pistacia cinsi zigotik embriyolarının *in vitro* çimlenmesine etkisi*	26
Çizelge 4.5.	Melez Pistacia genotiplerinin izole edilmiş embriyolarının *in vitro* çimlenmesine BBD'lerinin etkileri*	27
Çizelge 4.6.	*Pistacia vera* L. X *Pistacia anlantica* L. hibritlerinde ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi	29
Çizelge 4.7.	*P. vera* L. X *P. anlantica* L. klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi	30
Çizelge 4.8.	ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi	31
Çizelge 4.9.	*P. vera* × *P. atlantica* hibritinde IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi	31
Çizelge 4.10.	Mantel korelasyon testi (p<=0.05)	33
Çizelge 4.11.	Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi	33

Çizelge 4.12. *P. vera* L. *X P. terebinthus* L. klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 35

Çizelge 4.13. *Pistacia vera* L. *X Pistacia terebinthus* L. klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 36

Çizelge 4.14. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 37

Çizelge 4.15. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 37

Çizelge 4.16. Mantel korelasyon testi (p<=0.05) 38

Çizelge 4.17. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi 39

Çizelge 4.18. *P. vera X P. vera* (kontrollü tozlaşma) klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 40

Çizelge 4.19. *P. vera* L. *X P. vera* L. (kontrollü) klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 41

Çizelge 4.20. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 42

Çizelge 4.21. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 42

Çizelge 4.22. Mantel korelasyon testi (p<=0.05) 44

Çizelge 4.23. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi 44

Çizelge 4.24. *P. vera* L. *X P. vera* L. (serbest) klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 46

Çizelge 4.25. *P. vera* L. *X P. vera* L. (serbest tozlaşma) klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi 47

Çizelge 4.26. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 48

Çizelge 4.27. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi 49

Çizelge 4.28. Mantel korelasyon testi (p<=0.05) 50

Çizelge 4.29. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi 51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 3.1.	Melez tohumlar **A)** *P. vera* × *P. vera* (Bar: 10) (kontrollü tozlaşma) **B)** *P. vera* × *P. vera* (Bar: 10) (serbest tozlaşma) **C)** *P. vera* × *P. terebinthus* (Bar: 16 mm), **D)** *P. vera* × *P. atlantica* (Bar:20 mm)	7
Şekil 4.1	**.** *P.vera* x *P.vera* (serbest tozlaşan) bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi (**a)** kontrol grubu, **b)** 1g/l Kin, **c)** 1 g/l BA, **d)** 1 g/l IBA **e)** 1g/l NAA)	28
Şekil 4.2	*P.vera* x *P.vera* (kontrollü tozlaşan) bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi (**a)** 1 g/l NAA, **b)** kontrol grubu, **c)** 1 g/l IBA **d)** 1 g/l BA **e)** 1 g/l KİN)	29
Şekil 4.3	*P.vera* x *P.terebinthus* bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi (a) 1g/l NAA, b) 1g/l IBA, c) 1g/l BA, d) 1g/l KİN e) kontrol grubu)	31
Şekil 4.4.	A;ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram B; IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram	35
Şekil 4.5.	Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram	37
Şekil 4.6.	A; ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram B: IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram	41
Şekil 4.7.	Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram	42
Şekil 4.8.	A;ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram. B;IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram	46
Şekil 4.9.	Birleştirilmiş belirteç sisteminde elde edilen dendrogram	48
Şekil 4.10.	A; ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram. B;IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram	53
Şekil 4.11.	Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram	54
Şekil 4.12.	Kültürden alınan bitkilerin torfa aktarılması	55
Şekil 4.13.	Bitkilerin saksılara aktarılması	55

KISALTMA VE SİMGELER

Atm	: Atmosfer
BAP	: 6-Benzilaminopurin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
°C	: Santigrat derece
Dk	: Dakika
D.Ü.	: Dicle Üniversitesi
EN	: Endemik
Gr	: Gram
Gr/l	: Gram/Litre
IAA	: İndolasetik asit
IBA	: İndolbütirik asit
KİN	: Kinetin
MS	: Murashige ve Skoog
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mg/l	: Miligram/Litre
NAA	: Naftalin asetik asit
NaOCl	: Sodyumhipoklorit

1. GİRİŞ

Pistacia vera L., (Antepfıstığı) Anacardiaceae familyasına ait dioik bir bitki türü olup yenilen kabuklu meyve veren bir türdür. Ayfer (1959)'e göre; Antep fıstığının iki tane gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar Yakın Doğu Gen bölgesi (Anadolu, Türkmenistan, Kafkasya ve İran) ve Orta Asya gen bölgesi (Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan ve Tacikistan)'dir (AL-Saghir M. G., 2009).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi Antepfıstığının ülkemizdeki en önemli gen merkezlerinden birisidir. Antep fıstığı özellikle Gaziantep, Şanlıurfa ve Siirt illerinde yüzyıllardan beri kurak koşullarda yetiştirilmektedir. Ancak İran ve özellikle Amerika'da taban arazide ve sulu koşullarda üretim yapılmaktadır. Ülkemizde verimli olan bahçelerde genellikle serbest tozlaşma sonucu Antepfıstığı tohumlarından gelişen bitkiler anaç olarak kullanılmıştır (Uygur, 1986). Yeni kurulacak bahçeler için antep fıstığı fidan talebi hala yeterli ölçüde karşılanamadığından üreticilerin çoğu bahçeyi kurduktan sonra, birkaç yıl bekledikten sonra aşılama kalınlığına gelen bitkilere aşı yapmaktadır. Bunun sonucu olarak yabani (serbest) tozlaşmadan dolayı aşılandığı tür çeşidi ile uyumsuzluk gösteren fidanlara ara aşı yapılması gerekmekte ve dolayısıyla ilk ürün alınması geç olmaktadır. Antep fıstığı yetiştiriciliğinin geliştirilmesini etkileyen en önemli faktör üretimin geç olmasıdır. Diğer bir deyişle, antep fıstığı fidanı üretiminde kullanılan geleneksel yöntemler talepleri karşılamakta belirgin bir şekilde yetersiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle aşı kalınlığına daha erken ulaşan, aşılandığı kültür çeşidi ile uyumsuzluk göstermeyen, çıtlama oranı yüksek daha iyi verimli, periyodisite eğilimi göstermeyen ya da az olan ve iri taneli meyve veren anaçlar kullanılmalıdır.

İran'da antepfıstığı bahçelerinin tesisinde beş tip anaç kullanılır. Bunlar: iki tür (*Pistacia mutica* F&M. ve P. khinjuk), bir yabani *P. vera (P. vera* "Sarakhs") ve iki melezdir ("Badami -Riz" ve "Ghazvini"). refs yaz).. *P. mutica* F. & M. İran'a özgü bir yabani türdür (Zohary 1952; Tabatabaee, 1965) ve *P. atlantica* Desf'e benzer veya bu taksonun bir alt türüdür (Rechin ger, 1969; Sabeti, 1994).

Kaliforniya'da antepfıstığında anaç ıslahı üzerine yoğun çalışmalar, 1970'li yıllarda başlamış ve bugün bile ıslah çalışmaları sonucu tescillenen 5 anaç (*P. terebinthus, P. atlantica, P. integerrima*, PG II, UCB II) üzerine *P. vera* L.'nin sadece iki çeşidi; dişi kültür çeşidi "Kerman" ve erkek tozlayıcı "Peters" kullanılarak farklı

ekolojik özelliklere sahip bölgelerde periyodik olarak tekrarlanmaktadır. Bu anaçlardan ilk ikisi tam adları melengiç (Terebinthus) ve Atlantik sakızı (Atlantica) ve diğer üçü ise ticari veya kısa isimleri ile bilinirler: Bunlar; Integerrima, Pioneer Gold I (PGI) ve melezler; P. integerrima X P. atlantica (Pioneer Gold II; PGM; serbest tozlanma), ve P. atlantica X P. integerrima melezidir (UC Berkeley I; UCB I; kontrollü tozlanma). Ağaçların iyi gelişmesi, erken ürün alımı ve yüksek verim eldesi, Verticillium ve tuzluluğa toleranslı olması nedeniyle kontrollü tozlaştırılmış bir melez anaç olan UCB I günümüzde bahçe tesisinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

2019 Ocak ayı itibarı ile ülkemizde henüz tescillenmiş bir anaç üretim programı uygulanmamaktadır. Her ne kadar bu konuda birçok araştırma projesi rapor edilmişse de, ülkemizde 1974'te Özçağıran ile başlayan anaç ıslah çalışmaları, Bilgen vd. (1985)'in çalışması ile devam etmiştir. Kafkas ve Kaşka (1998) yaptığı bir çalışma ile farklı türlere ait 15 kombinasyondan üretilen melez tohumların anaçlık özelliklerinin araştırıldığı bir çalışma rapor etmiştir(Atlı vd. 2004). Ebeveyn olarak saptanan 4 P. khinjuk Stocks (buttum) dişi tipi ile 5 P. vera L., 5 P. khinjuk Stocks (buttum), 5 P. atlantica Desf. ve 5 P. terebinthus L. erkeği arasında türler içi ve türler arası melezlemelerin anaçlık özellikleri belirlemek için bir çalışma yapmış ve ümit veren antepfıstığı melez anaç adaylarını saptamıştır. Ancak, yukarıda rapor edilen ve hiçbir araştırma çalışmasının sonuçlarının uygulanması üretim için kullanılmamış ve bugünde kullanılmamaktadır.

Bu kapsamda bu tezde, yapılan literatür çalışmalarına göre, ülkemizde doğal olarak yetişen Pistacia genusuna ait bazı türlerden üretilen melez genotiplerin *in vitro* büyüme gelişme özelliklerinin tespitinde kullanılacak bir doku kültürü tekniği olan embriyo kültürü protokolü geliştirilecektir. Böylece anaç adayı olabilecek melez antepfıstığı genotiplerinin ıslah aracı olarak kullanılması ve anaçlık özelliklerinin hızlı bir şekilde tespit edilmesine katkı sağlayacak bilgiler elde edilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Embriyo kültürü, tohumlardan ve olgunlaşmamış ovüllerden izole edilen embriyoların besin ortamında olgunlaşması için kullanılan bir bitki doku kültürü tekniğidir. Embriyo kültüründe, bitki doğrudan embriyodan veya dolaylı olarak somatik hücrelerden önce kallus ve daha sonra bu kallusdan sürgün ve kök oluşumu yoluyla geliştirilir. Bu teknik; tohumda dormansiyi kırmak, tohumların canlılığını belirlemek, egzotik/nadir türlerin ve haploid bitkilerin üretimini sağlamak, tohumu çimlenmeyen ve gelişmenin erken evresinde embriyosu gelişmeyen bitki türlerin doğrudan rejenerasyonu için geliştirilmiştir (Sahni vd., 2017).

İzole edilen embriyoların kültür ortamında hızlı büyümesiyle bitkilerin ıslah döngüsü kısalır. Ayrıca bu yöntem tohumlardaki uzun dormansi sürelerini de kısaltan etkili bir tekniktir. Bazen embriyo kurtarma olarak adlandırılan embriyo kültürü, yarım yüzyıldan fazla bir süredir, başka türlü dejenere olabilecek hibrit döllenme ürünlerini korumak için kullanılan *in vitro* bir tekniktir (Norstog, 1979).

Embriyo kültüründe ilk başarılı sonuç, 1904'te, ustaca izole edilmiş ve şekerle desteklenmiş bir mineral besi ortamında yetişen iki olgun embriyolardan canlı bitkiler elde eden Hanning tarafından gerçekleştirildi (Norstog, 1979).

1924'te Dietrich, dormansi periyodunu tamamlamadan çimlenip çimlenmeyeceklerini belirlemek için bazı bitki türlerinin olgun ve olgunlaşmamış embriyoları kültüre aldı. Olgunlaşmış embriyolara dormansın etkisi olmaksızın hızlı bir şekilde geliştiğini olgunlaşmamış embriyolarda düzensiz bir çimlenme gözlendiği rapor edildi.

Laibach, ilk kez 1925'de türler arası melez zigotik embriyo kültürünü tanımladı. *Lineum perenne* L. x *Lineum austriacum* L. arasındaki tür içi tozlaşmadan gelişen tohumlar üretilmiştir; Ancak, bu tohumların embriyoları gelişmenin erken evresinde izole edilir ve *in vitro* kültürüne alınırsa embriyo düşüğünün üstesinden gelinebilir.

Daha sonra, Van Overbeek ve ark.(1941) küçük *Datura* hibrit embriyolarının, Hindistan cevizi sütü içeren besi ortamında iyi geliştiğini rapor etmiştir. Bu sonuç azaltılan azot miktarının embriyo kültüründe öneminin anlaşılmasını sağlamıştır.

1940'lı yılların başlarında embriyonik gelişmenin kültür ortamında besinsel ve fiziksel gereksinimlerini belirlemek için, tohum dormansı baypas edilerek, üreme döngüsünü kısaltmak, tohum canlılığını test etmek, mikro-çoğaltma materyalini temin etmek ve uyumsuz tozlaşmadan olgunlaşmamış embriyoları kurtarmak için embriyo kültürü yoğun bir şekilde kullanılmıştır.

2.1. Embriyo Kültürünün Kullanım Alanları

Bitki ıslahında embriyo kültürünün en önemli uygulaması, tür içi melezlerin üretimine olanak sağlamasıdır. Birçok başarısız melez uygulamalar embriyo düşüğüne sebep olur. Erken embriyo düşüğünün başlıca nedeni endospermin düzgün gelişememesi nedeniyle oluşur (Hu ve Wang, 1986). Diploidler ve tetraploidler arasında tür içi, türler arası melezler ile endosperm oldukça zayıf gelişir veya hiç gelişmez. Bir besin ortamında embriyonun aseptik olarak kültüre alınarak, bu problemin üstesinden gelinebilir. Bazı canlı olmayan melez embriyolar, ana bitkinin içindeki zigot oluşumu sonrası ortaya çıkan engelleri aşarak gelişime başlama potansiyeline sahip olabilir. Tür içi ve türler arası melezlerden gelişen embriyolar olduğuna dair birçok başarılı örnek mevcuttur (Sharma ve Gill, 1983; Ramming, 1990; Williams, 1980; Wiliiams ve ark., 1982; Williams ve De Lautour, 1980).

Embriyo kültürü ile tohumlardaki dormansinin üstesinden gelerek ıslah döngüsünü kısaltılabilir. Bitkilerde dormans; endojen inhibitörlerden, ışık gereksinimlerinden, düşük sıcaklıklardan, kuru depolama şartlarından ve embriyo olgunlaşmamasından kaynaklanabilir (Yeung ve ark., 1981). Tohum kabuğununda veya tohumda dormansi uyuşukluğu faktörleri, tohumda, endospermde veya her ikisinde lokalize olabilir. Embriyolar bu faktörlerin etkilerinden uzaklaştırılırsa, embriyolar çimlenir, hızla büyür ve ıslah döngüsü kısalır. Bazı durumlarda izole embriyolar vernalize edilebilir böylece ıslah süresi 40 gün azaltılabilir (Sharma ve Gill, 1983). Embriyo kültürünün uygulamalı kullanımlarına ek olarak, prosedür temel çalışmalarda yararlıdır. Ovülün dışında büyüyen embriyolar (ex ovule) gelişimin çeşitli aşamalarında embriyoların beslenme ve metabolizmasını incelemek için mükemmel bir yoldur. Bu teknik aynı zamanda embriyoların büyüme gereksinimlerini, fitohormonların gelişimi ve zigotik embriyogenez üzerine çevre koşullarının etkilerini ve tüm embriyoların rejenerasyon potansiyelini incelemek için kullanılmış olabilir (Yeung ve ark., 1981).

Embriyo kültürü, çimlenme promotörlerinin ve inhibitörlerini lokalize etmek embriyogenez çalışmaları için ve kriyoprezevasyon için kullanılabilir (Grout, 1986). Uzak hibridizasyonun ardından kromozomları elimine ederek haploidler üretmek için Embro kültürü kullanılabilir. Bu paternal kromozomların elimine edildiği haploidler maternal embriyoların kurtarılmasıyla oluşturulabilir. Bu durumlarda döllenme meydana gelir, ancak polen ebeveyn kromozomları daha sonra tohum ebeveyni tarafından elimine edilir. Haploid embriyonun canlılığı ancak embriyo kültürü sayesinde elde edilebilir. Kurtarılmış embriyonun kromozom katlanmasıyla bir homozigot monoploid üretilir. Embriyo kültürü bitkileri vejetatif olarak çoğaltmak için kullanılabilir. Hem genç hem de yetişkin özelliklerine sahip cinslerden embriyolar vejetatif çoğalma için başlangıç materyali olarak kullanılır. Embriyolar kültüre iyi cevap verir çünkü onlar gençtir. Buğdaygiller ile organogenez, genç kallus dokusundan kolayca oluşur. Kozalaklı bitkilerin çoğaltılması genç embriyoların ve aksiller sürgünlerinden kalluslar aracığıyla oldukça kolaydır. Bununla birlikte, bu teknikle ilgili en önemli problem, birçok turunçgil türünde olduğu gibi embriyolar nükleus dokusundan gelişmedikçe klonlar zigotik materyalden üretilmez. Embriyo kültürü normal gelişimini tamamlamadan embriyoların düzensiz çimlenmesini çalışmak için kullanılabilir. Genellikle erken çimlenme, zayıf fide gelişimine neden olur. Doğada embriyoların düzensiz gelişimini düzenleyen faktörleri belirlemek için embriyolar embriyolojik gelişimin neyi teşvik ettiğini belirlemek için çeşitli koşullar altında kültüre alınabilirler. Negatif ozmotik potansiyel *in vivo* koşuldan daha yüksek bir değerde olduğundan veya testa uzaklaştırıldığı zaman inhibitör etkisi kaybolur ve erken çimlenme meydana gelir. Prunus'ta erken çimlenme, integumentlerin doğal bir inhibitör görevi gördüğü ovül kültüründe önlenmiştir (Ramming, 1985). Embriyo kültürü tohum canlılığını belirlemede çok faydalıdır. Bu kullanım, olgunlaşmamış şeftali tohumlarının eksize embriyolarının büyümesi ve sonradan gelişen tohumların çimlenmesi arasında iyi bir ilişki olduğunu ortaya koyan erken bulgulardan ortaya çıkmıştır (Tukey, 1944).

2.2. Embriyo Kültürü Teknikleri

Çoğu durumlarda embriyolar ovaryum içinde steril ortamda geliştiği için izole embriyoların yüzey sterilizasyonuna gerek kalmaz. Bunun yerine embriyo taslağı ve ovaryum yüzey sterilizasyonu yapılır ve daha sonra embriyoların etrafındaki dokulardan

aseptik olarak ayrıştırılır. Embriyolar kendisini çevreleyen dokularla çok iyi korundukları için yoğun sterilantlar yüzey sterilizasyonu için kullanılabilir. Bu yüzden embriyoların aksenik kültürleri kolaylıkla başlatılabilir.

Embriyoların doğrudan yüzey sterilizasyonu eğer tohum kabuğu çatlaksa veya tohum kabuğunun iç kısmına endofitik patojenler bulaşmışsa mısır tohumlarında olduğu gibi embriyoların doğrudan strelizasyona ihtiyaç olabilir. Embriyoların diseksiyonu problemli olabilir. Büyük embriyoları izole etmek zor değildir. Ancak küçük embriyoların yaralanmadan izolasyonu için bir diseksiyon mikroskobu ve mikro diseksiyon aletlerinin kullanımına ihtiyaç vardır. Embriyolar tohum kabuğu(testa) kesilirse embriyolar kolayca zarar görür; izole edilmiş embriyoların kültür sırasında kuruyabileceği hususuda göz ardı edilmemeli bu yüzden izole edilmiş embriyolar hızlı bir şekilde kültüre alınmalıdır (Rangan 1984).

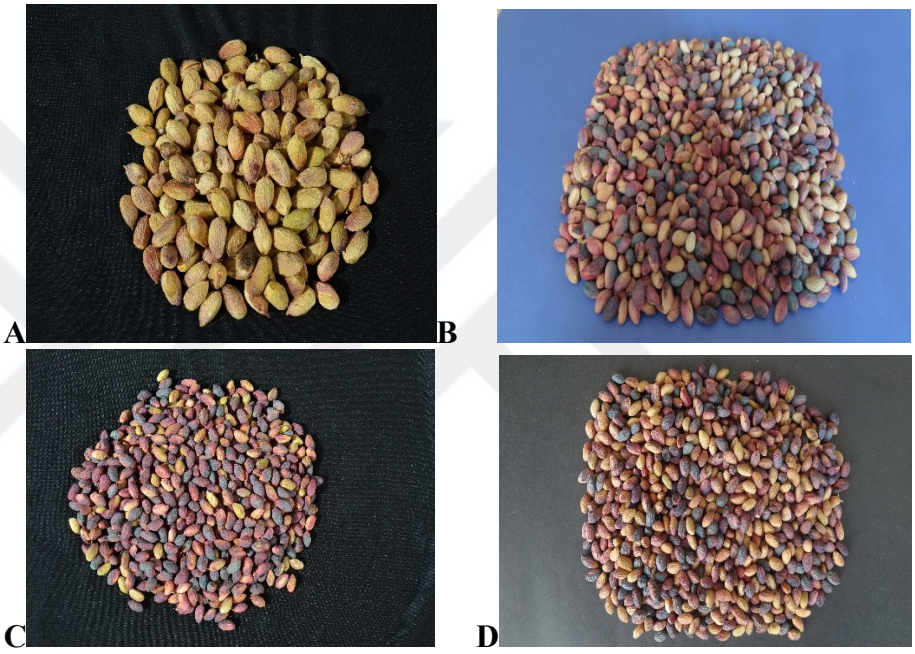
Olgunlaşmamış embriyoların izolasyon süreci türlere göre değişir ancak çoğu kez genç ovülün mikrofilar ucunda ki bir yaralanma ve bunun karşı tarafına uygulanan bir basınçtan dolayı yaralanma meydana gelebilir. Embriyoyu sıvı bir endosperm çevreliyorsa kırılgan embriyonik dokular uygulanacak basınçtan dolayı zarar görebilir. Kalp safhası ve daha önceki embriyo safhalarında izole edilen embriyo formlarında süspensörlerin bir bütün halinde muhafaza etmek başarılı bir embriyo kültürü için oldukça önemlidir (Hu ve Wang, 1986).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyalinin Temini

Bu çalışmada Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü bahçesinde bulunan *P. terebinthus* L. *P. vera* L., ve *P. atlantica* L. Defs. türlerinin hem erkek hem dişi genotiplerinin kontrollü tozlaştırılması ile 4 çeşit melez genotipin (*P. vera x P. vera* (serbest tozlaşma), *P. vera* x *P. vera* (kontrollü), *P.vera* x *P. terebinthus* (kontrollü), *P.vera* x *P. atlantica* (kontrollü,)) tohumları üretilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Melez tohumlar **A)** *P. vera* × *P. vera* (Bar: 10 mm) (kontrollü tozlaşma) **B)** *P. vera* × *P. vera* (Bar: 10 mm) (serbest tozlaşma) **C)** *P. vera* × *P. terebinthus* (Bar: 16 mm), **D)** *P. vera* × *P. atlantica* (Bar:20 mm)

3.1.2. Besi Ortamının Hazırlanması, Yüzey sterilizasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar

Besi ortamlarının hazırlanmasında ve yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Deney çalışmalarında kullanılacak olan besi ortamları Çizelge 3.2., besi ortamlarına eklenecek olan bitki büyüme düzenleyicileri Çizelge 3.3. ve kullanılacak cihazlar Çizelge 3.4.)'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. Besi ortamlarının hazırlanmasında, somaklonal varyasyon belirlenmesinde ve yüzey sterilizasyonunda kullanılacak kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	Ticari
ACE	Gamble Tüketim	Ticari
Glisin	Merck	K-27061401
Nikotinik asit	Sigma	N-0765
Tiamin HCl	Sigma	T-3902-25
Piridoksin HCl	Sigma	P-8666
Myo-inositol	Sigma	I-3011
Agar	Sigma	A-1296
Sakkaroz	Sigma	S-5391
Glikoz	Sigma	G-7520
IAA (Indolasetik asit)	Sigma	İ2886
IBA (Indolbütirik asit)	Sigma	I-5386
NAA (Naftalenasetik asit)	Sigma	N-0640
KIN (Kinetin)	Sigma	K-0753
BA (Benzil adenin)	Sigma	B-3408-5
NH_4NO_3 (Amonyum nitrat)	Sigma	A-3795
KNO_3 (Potasyum nitrat)	Sigma	P- 8291
KH_2PO_4 (Potasyum fosfat)	Sigma	P-8416
$CaCl_2.2H_2O$ (Kalsiyum klorür)	Sigma	C-2536
$MgSO_4.7H_2O$ (Magnezyum sülfat)	Sigma	M-7774
H_3BO_3 (Borik asit)	Sigma	B-9645
KI (Potasyum iyodür)	Ridel-de Haen	03124
$MnSO_4.4H_2O$ (Mangan sülfat)	Sigma	M-7899
$ZnSO_4.7H_2O$ (Çinko sülfat)	Sigma	Z-1001
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (Molibdik asit)	Sigma	M-1651
$CuSO_4.5H_2O$ (Bakır sülfat)	Sigma	C-8027
$CoCl_2.6H_2O$ (Kobalt klorür)	Sigma	C 2911
$FeSO_4.7H_2O$ (Demir sülfat)	Sigma	F-8263
Na_2EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	E-6635
dH_2O		

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan besi ortamı içerikleri

Kimyasallar	MS	WPM	SH
NH4NO3	1650 mg	400 mg	
KNO3	1900 mg	0mg	
KH2PO4	170 mg	168 mg	
Ca(NO3)2	0mg	460 mg	
MgSO4.7H2O	370 mg	368 mg	
CaCl2.2H2O	440 mg	72 mg	
K2SO4	0mg	988 mg	
MnSO4.H20	16.9 mg	16.9 mg	
ZnSO4.7H2O	8.6 mg	8.6 mg	
Na2MO4.2H2O	0.25 mg	0.25 mg	
KI	0.83 mg	0.83 mg	
H3BO4.	6.20 mg	6.20 mg	
CoCl2.6H2O	0.025 mg	0.025 mg	
CuSO4.5H2O	0.025 mg	0.025 mg	
FeSo4	28 mg	28 mg	
Na2EDTA	37 mg	37 mg	
Glycine	2 mg	2 mg	
Nicotinic Acid	0.5 mg	0.5 mg	
Thiamin HCl	0.1 mg	0.1 mg	
Pyridoxine HCl	0.5 mg	0.5 mg	
Sakkaroz	30 g	30 g	
Myo-İnositol	100 mg	100 mg	
Agar	6.4 g	6.4 g	
pH	5.8	5.8	
Tamamlanan Distile su	1000ml'e	1000ml'e	

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarına ilave edilen BBD'ler

İçerik	Miktar
6-Benzyladenin (BA)	100 mg
1 N HCl	2-3 ml
dH2O	100 ml'e tamamlama
Kinetin (KIN)	100 mg
1 N HCl	2-3 ml
dH2O	100 ml'e tamamlama
α-Naftalenasetik asit (NAA)	100 mg
1 N HCl	2-3 ml
dH2O	100 ml'e tamamlama
3-İndolbutirik asit (IBA)	100 mg
1 N HCl	2-3 ml
dH2O	100 ml'e tamamlama

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz İsmi	Model	Firma	Ülke
Buzdolabı (+4ºC)	BK 8450 T	Beko	Türkiye
Derin Dondurucu (-20)	GS51NAW30	İndesit	Türkiye
Derin Dondurucu (-80 °C)	Forma 8600	Thermo	ABD
Hassas Terazi	XT 320M	Precisa	Türkiye
Çalkalayıcı	0425966	J.P.Selecta	İspanya
pH Metre	211	Hanna	Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Are	Velp	İspanya
Etüv	0462637	J.R.Selecta	İspanya
Fırın	6330N	Beko	Türkiye
Saf Su Cihazı	Arium 611	Sartorius	İspanya
Laminar Akımlı Kabin	MH-100	Telstar	İspanya
Santrifüj	D-78532	Hettich	Almanya
Sıcak Su Banyosu	MP	Julaba	Almanya
Vortex	Vortex Mixer	VWR	ABD
Mikrodalga Fırın	MW71E	Samsung	Malezya
Liyofilizatör	RC101	Jouan	Almanya
Elektroforez Sistemi	MS09092879	Cleaver	İngiltere
Jel Dökümantasyon Sistemi	Chemidoc XRS^{+}	BioRad	ABD
Nanodrop	BioSpec-Nano	Shimadzu	Japonya
Otoklav	CL-40M	Alp	Japonya

Çizelge 3.5. gDNA izolasyonu ve miktar tayininde kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
Sıvı Azot	Messer	PL-N2-089B
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	
CTAB (SetilTrimetil Amonyum Bromid)	Merck	1.02342.0100
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Trisma Base	Sigma	T6066
NaCl	Sigma	S3014
EDTA	Calbiochem	324503
β-Merkaptoetanol	Applichem	A,11080,0100
PVP (Polivinil pirolidon)	Sigma	P-2307
Kloroform	Sigma	372978
Oktanol	AppliChem	A3461.1000
RNaz A	Intron Biotechnology	27062
Proteinaz K	Intron Biotechnology	32181
Agaroz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
λ DNA-Hind III	Fermentas	SM0103
Distile Su (dH_2O)		

Çizelge 3.6. PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
Taq DNA polimeraz PZR kiti	Intron Biotech.	25022
dNTP	Intron Biotech.	25022
$MgCl_2$	Intron Biotech.	25022
Agaroz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
1 kb DNA belirteç	Invitrogen	10488-072
100 bp DNA belirteç	Invitrogen	10488-058
dH_2O		

3.2. Metot

3.2.1. BBD'lerin ve Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kullanılan BBD'lerinin stok çözeltileri Çizelge 3.3.'e göre hazırlandı. Bununla birlikte, tez çalışmasında istenilen miktarlarda kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinin stoklarının hazırlanması için hassas teraziyle belirlenen miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri tartıldıktan sonra, önce az miktar çözücü (dH_2O) ilave edilip, 1 Normal HCl çözeltisinden homojen olarak çözünmesi için damlatılarak, çözündükten sonra bitki büyüme düzenleyicileri stokları hazırlandı ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de buz dolabında muhafaza edildi. Isıtıldığında kimyasal yapıları bozulan, örneğin KIN gibi bitki büyüme düzenleyicileri, otoklavlandıktan sonra besi ortamına ilave edildi. 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak besi ortamının pH'sı otoklavlanmadan önce 5.8' e ayarlanarak hazırlandı.

Çizelge 3.2.'de önerilen katılaştırıcı ilave edilen besi ortamını 1.2 atm basınç ve 121°C'de altında 15 dk sterilize edildikten sonra soğuması beklenip sıcaklık takriben 65°C iken laminar akımlı olan kabin içerisinde Magenda kaplarına döküldü. Kültür

kapları ağzı açık bırakılıp soğuduktan sonra ağızları kapatılarak daha sonra kullanılmak üzere steril bir ortama bırakıldı.

3.2.2. Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu

Çalışma esnasında kullanılacak cam malzemeler yıkanıp, saf ve sıcak su ile durulandı ve etüvde 3 saat 180 °C'de sterilizasyona tabi tutuldu. Kültür kapları (Magenda GA-7) sıcak suda yıkanıp, saf sudan geçirilerek kurutuldu. Daha sonra kültür kapları alüminyum folyoyla sarıldı. 1 atm basınç altında 121 °C'de ve 25 dakika otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirildi. Çalışma esnasında kullanılacak filtre kağıtları ise 180 ºC'de 2 saat, besi ortamı ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacak saf sular da etüvde 180 ºC'de 3 saat bekletilerek steril edildi.

3.2.3. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Bistüri ve pensler %80'lik etil alkol ile temizlenip bir düzine halinde alüminyum folyolara sarıldıktan sonra, 180º C'lik bir kuru sterilizatör cihazında 30 dk sterilize edildi.

3.2.4. Çalışma Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kültür odasındaki tüm çalışma tezgahları ve özellikle Laminar kabinin iç yüzeyi %70'lik alkol ile silindi. Çalışmaya başlanmadan önce kültür odasında 1 saat U.V. lambası açılarak sterilizasyon sağlandı.

3.2.5. Yüzey Sterilizasyonu Teknikleri

İn vitro doku kültürü çalışmalarında sadece önemli olan sterilizasyon işlemlerinde kullanılacak materyallerin kontaminasyonlardan arındırılmış olması değil, aynı zamanda sterilizasyon sırasında materyallerin biyolojik aktivitelerini kaybetmemeleridir. Bu yüzden kullanılacak sterilantın çeşidi ve yüzdesi son derece önemlidir. Çalışmalarda kullanılan melez Pistacia tohumlarının embriyoları *in vitro* koşullarda herhangi bir mantar veya bakteri kaynaklı enfeksiyonunu engellemek ve kontaminasyon oluşmasını önlemek için, başlangıç materyallerinin yanı sıra; çalışmanın yapıldığı ortamın, besi ortamlarının, kullanılan alet ve kültür kaplarının tamamen steril ortamda hazırlanıp kullanılma aşaması son derece önem eder. Bu nedenle sterilize edilecek materyaller için, en uygun yüzey sterilizasyon tekniğinin bulunması gerekir. Bunun yanında, geliştirilen bu tekniğin, bütün parazitleri imha edecek, aynı zamanda

kullanılan materyalin sistemine zarar vermeyecek uygun bir metod olması gerekmektedir.

3.2.6. Büyüme Odası Koşulları

Kültür odasında 3000-5000 lüx'lük ışık şiddetine sahip floresan ampuller ile aydınlanma sağlanmaktadır. Ortamın sıcaklığı 25±2 ºC ye ayarlanmıştır. Ayrıca fotoperiyod, zaman ayarlayıcısı yardımı ile aydınlık/karanlık, 16 saat / 8 saat olacak şekilde ayarlandı.

3.2.7. Besi Ortamlarının İçeriği

Yapılan deneysel çalışmalarda MS besi ortamının en iyi olduğu belirlendikten sonra tümünde, Murashige ve Skoog (MS-1962)'un modifiye edilmiş temel besi ortamı kullanıldı. Yapılan deneylerde MS besi ortamı (1 Litre) çizelge 3.2'de belirtilmiş olup verilen ölçülerde hazırlanmıştır. Araştırmanın amacına göre uygun BDD, şeker ve MS'in kuvvetleri seçilip eklenerek besi ortamının pH'ı pH metre ile 5.8 olarak ayarlandı. Kültür besi ortamına katılaştırma maddesi olarak 5.8 g agar eklendi ve hazırlanan besi ortamı, 121 ºC'de 25 dakika süre ile otoklavda, 1 atm basınç altında steril edildi. Daha sonra besi ortamı, sterilize edilen kabin içinde Magenta GA-7 kaplara eşit bir şekilde bırakılmıştır.

3.2.8. Embriyo Kültürü Çalışmaları

4 melez Pistacia tohumlarının embriyoları steril bir ortamda izole edildi ve aşağıdaki deneylerde kullanıldı.

3.2.8.1. Besi Ortamı Tipinin İzole Edilmiş Pistacia Melez Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi

Bu deneyde 4 farklı meleze ait zigotik embriyolar izole edildi ve hormonsuz tam kuvvetteki MS, WPM ve SH besi ortamlarında kültüre alındılar. Deney iki defa tekrarlandı ve 21 günlük kültür süresi sonunda morfolojik gelişimlerin yanı sıra çalışılan parametrelerde çimlenen eksplantın (embriyonun) çimlenme yüzdesi (%), kök uzunluğu (cm), sürgün uzunluğu (cm) ve nod sayısı rapor edildi.

3.2.8.2. MS Besi Ortamı Kuvvetinin İzole Edilmiş Melez Pistacia Genotipi Zigotik Embriyolarının İn Vitro Çimlenmesine Etkileri

Bu deneyde 4 farklı meleze ait zigotik embriyolar bir önceki çalışmada en iyi sonuç veren MS besi ortamının 1/4x, 1/2x, 1x, 2/1x oranlarında hormonsuz besi ortamlarında izole edilmiş zigotik embriyolar kültüre alındı. Deney iki defa tekrarlandı ve 21 günlük kültür süresi sonunda çalışılan morfolojik gelişimlerin yanı sıra çalışılan parametrelerde çimlenen eksplant (embriyonun) çimlenme yüzdesi (%), kök uzunluğu (cm), sürgün uzunluğu (cm) ve nod sayısı rapor edildi.

3.2.8.3. Karbonhidrat Çeşidinin İzole Edilmiş Melez *Pistacia* Genotipi Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkisi

Bu deneyde izole zigotik embriyolarının çimlendirilmesinde karbonhidrat çeşidinin etkisi çalışıldı. Bir kontrol grubu ile birlikte 30 g/lt glikoz ve sükroz içeren tam kuvvetteki MS besi ortamında izole embriyolar kültüre alındı. Deney iki defa tekrarlandı ve 21 günlük kültür süresi sonunda her bir karbonhidrat tipi için çimlenme yüzdesinin yanı sıra morfolojik gelişimleri çalışılan parametrelerde çimlenen eksplant (embriyonun), kök uzunluğu (cm), sürgün uzunluğu (cm) ve nod sayısı rapor edildi.

3.2.8.4. BBD'lerinin Melez Pistacia Genotiplerinin İzole Edilmiş Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri

Bu deneyde izole zigotik embriyolar 1 mg/l NAA, BA, IBA ve KİN içeren MS besi ortamında kültüre alındı. Deney iki defa takrarlandı ve her deney çalışmasında 21 günlük kültür süresi sonunda her bir BBD için morfolojik gelişimlerin yanısıra çalışılan parametrelerde çimlenen eksplant (embriyonun) çimlenme yüzdesi (%), kök uzunluğu (cm), sürgün uzunluğu (cm) ve nod sayısı rapor edildi.

3.2.9. Kültür Odası Koşulları

Kültürler 8000'lüx'lük ışık şiddetine kadar ayarlanabilir cıvalı Flüoresan lambalı (400 w, MBFR/U, Thorn) büyüme odasına transfer edildi ve ortam sıcaklığını 24°C ye ayarlandı. Ayrıca fotoperiyodik sistem ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde oluşturulan bir ortamda kültürlerin gelişebilmesi için gerekli ortam sağlandı.

3.2.10. Adaptasyon

Köklenen fideciklerin kökündeki agarı arındırmak için ilk önce akan çeşme suyunda yeterli miktarda yıkandı. Daha önce sterilizatörde steril edilmiş kum ve torftan oluşan karışım hazırlandı. Karışıma ekilen fidelerin %90±5 bağıl nemini korumak için fidelerin üzerleri en az iki hafta naylon poşetlerle kapatılıp 3. günden sonra her gün havalandırma miktarını kademeli bir şekilde artırılıp havalandırıldı. Daha sonra fidelerin bağıl nemi yaklaşık %60±5'e dereceye düşürüldü. Bitkilerin bulunduğu ortama 2 günde bir düzenli şekilde su damlatıldı.

Ayrı saksılar içindeki fideler büyüme odasına alınıp gündüz gece sıcaklığı 24°C'ye ayarlanan 16 saat ışık 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot (20 μmol m^{-2} s^{-1}) altında gelişmeye bırakıldı. 5-6 haftalık adaptasyon sürecinden sonra, fideler bahçeye ekilmeye hazır hale geldiler.

3.2.11. İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi)

Tüm çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerin anlamlı olarak değerlendirilmesi için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri yapılmıştır (SPSS 2.0). Test edilen işlemler arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için, faktöriyel veya nonfaktöriyel deneylerden alınan veriler ANOVA'ya tabi tutuldu. Belirlenen istatistiksel farklılıklar P = 0.05 seviyesinde LSD testine tabi tutuldu.

Oransal veriler durumunda Ki kare ($\chi 2$) testi uygulanmıştır.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

$P > 0.05$ = önemli değil

$P < 0.05$ = önemli

$P < 0.01$ = çok önemli

$P < 0.001$ = oldukça çok önemli

3.3. *P. vera* L. Klonlarının Genetik Analizleri

3.3.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

Melez 4 farklı pistacia genotiplerine ait BA'lı ortamda alt kültürlere alınan yaprak numuneleri -80 ºC'de saklandıktan sonra gDNA izolasyonu CTAB (Lodhi ve ark., 1994) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, derin dondurucuda (-80 ˚C) saklanan yaprak numunelerinden (100 mg) tartılarak ve sıvı azotla ezilerek 1 ml CTAB ekstraksiyon çözeltisiyle karıştırıldı.

Karışım, 15 ml'lik falkon tüplere konulup üzerlerine, 0.5 mg PVP eklendi ve birkaç defa çalkalandı. Su banyosuna (60˚C) alınan örnekler birkaç defa karıştırılarak 25 dakika süreyle inkübe edildi ve oda sıcaklığına alınarak soğutuldu. Karışımın üzerine 0.6 ml kloroform/oktanol (24:1) eklenerek 20-25 defa hızlı bir şekilde çalkalandı ve karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Üst faz (az olması durumunda) ependorf tüpe aktarıldı. Elde edilen çözeltiye 0.05 hacim 5M NaCl eklenerek iyice karıştırıldı. Çözeltiye 0,1 hacim soğuk (-20 ˚C) %95'lik etanol eklendi ve 4˚C'de DNA iplikçikleri belirene kadar bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında sırasıyla 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üst sıvı dökülüp pelet soğuk %76'lık etanolle yıkandı. Tüpler 37˚C'de etüvde etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildi. DNA steril distile suda (50 µl) çözüldü. Örneklere son derişimi 0.01 mg/ml olacak şekilde 1 mg/ml RNAaz çözeltisi eklenip 37ºC'de 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örneklere 1 mg/ml proteinaz K çözeltisi son derişimi 0.01mg/ml olacak şekilde eklenerek 37ºC'de 30 dakika inkübe edildi. İzole edilen gDNA'ların 260-280 nm dalga boylarında spektrofotometrik (Nanodrop) ölçümleri yapıldı.

3.3.2. ISSR Analizleri

ISSR analizleri için kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 3.5.'de verilmiştir. PCR-ISSR reaksiyonları toplam 25 µl hacimde yapılmıştır. ISSR-PCR amplifikasyon ürünleri (15 µL), 1×TAE tamponu içerisinde hazırlanan %1.5'lik agaroz jele yüklenip, 80 V'da 70 d yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak, ultraviyole ışık altında dijital olarak görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.3. IRAP Analizleri

IRAP analizlerinde IRAP 2, 4, 5, AYF ve TMS primerleri kullanılmıştır. IRAP-PCR amplifikasyon ürünleri (15 µL), 1× TAE tamponu içerisinde hazırlanan %1.5'lik agaroz jele yüklenip, 80 V'da 70 d yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak, ultraviyole ışık altında dijital olarak görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler JUMP 07 software ile hesaplandı. Her bir deney en az 30 eksplant olacak şekilde iki tekrarlı uygulandı. Gözlemler, büyüme parametreleri (proliferasyon yüzdesi, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu) göz önüne alınarak proliferasyonun 21. gününde hesaplandı. Proliferasyon yüzdesi = her ekplantın sürgün oluşturma sayısı x 100/toplam eksplant ve köklenme yüzdesi = her eksplantın kök oluşturdma sayısıx100/toplam eksplant şeklinde yüzde ortalamaları hesaplandı ve tablolardaki her bir genotipe ait kolon ve ona ait satır çoklu karşılaştırma olan ANOVA'ya göre $^{**}P \leq 0.05$, $^{***}P \leq 0.01$ ve $^{*}P \geq 0.05$ olarak hesaplandı ve ANOVA'yı takip eden herbir kolon LSD testi ile grublandırıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Dört farklı *P. vera* L. Melez Genotipinin Yüzey Sterilizasyonu

Melez tohumların yüzey sterilizasyonu için daha önce Çalar (2018) tarafından tespit edilen teknik kullanılmıştır. Bu metotta olgun *Pistacia vera* tohumları beher glasta %20 lik NaOCl de 20 dk hafif çalkalanmış daha sonra 5 er dk ara ile 3 kez saf sudan geçirilmiştir. Yüzey Sterilizasyonuna tabii tutulan tohumların embriyolarını kolay bir şekilde izole etmek için içinde saf su olan ağzı kapalı steril bir kap içerisine bırakılarak 6 saat laminar kabine bırakılmıştır. Daha sonra pens ve bisturi yardımıyla izole edilen embriyolar kültüre alınmıştır. Sonraki deneylerde aynı yöntemle embriyolar izole edilerek deneyler yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Dört farklı melez genotipin yüzey sterilizasyonu ve embriyolarının in vitro ortamına etkisi

Genotip	Aşırı Sterilize Olmuş Tohum (%)	Çimlenme Yüzdesi (%)	Kök Uzunluğu (cm)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Yaprak Sayısı
***P. vera* L. X *P. vera* L. (Serbest tozlaşma)**	12.00 ± 2.30c	88.00 ± 2.30a	2.35 ± 0.15a	1.72 ± 0.11a	6.66 ± 0.45ab
***P. vera* L. X *P. vera* L. (kontrollü tozlaşma)**	9.33 ± 1.33c	90.66 ± 1.33a	1.07 ± 0.17b	2.30 ± 0.30a	9.07 ± 2.32a
***P. vera* L. X *P. terebinthus* L.**	21.33± 1.33b	78.66 ± 1.33b	2.54 ± 0.63a	1.31 ± 0.10ab	6.00 ± 0.52ab
***P. vera* L. X *P. atlantica* L.**	28.00± 2.30a	72.00 ± 2.30c	1.22 ± 0.30b	1.27 ± 0.36b	3.71 ± 1.70b

*Veriler kültürün 21. gününde toplam en az 75 embriyonun ortalamasıdır.

**Çizelgede her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVAYI takip eden her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVAYI takip eden LSD testine göre $P \leq 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. SH: Standart sapma

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi en yüksek çimlenme oranı %90.66 ile kontrollü tozlaşan *P. vera* L. X *P. vera* L melezinde elde edilirken, serbest tozlaşan *P. vera* L. X P. vera L. melez embriyoları %88.00 oranında çimlenme gözlendi. Sürgün uzunluğu bakımından *P. vera* L. X *P. vera* (kontrollü tozlaşan) dört melez genotipi içerisinde en yüksek değeri vermiştir (2.30 cm). Serbest tozlaşan *P. vera* L. X P. vera L. melez embriyoların kök uzunluğu ise 2.35 cm olarak ve sürgün uzunluğu 1.72 cm olarak gözlendi. Yaprak sayısı bakımından ise kontrollü tozlaşan *P. vera* L. X *P. vera* L melezi en fazla değeri vermiştir (9.07). Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi dört farklı melez genotiptede aşırı sterilize olmuş yada çimlenmemiş embriyoları mevcuttur. Bu oranlar *P. vera* L. X *P. atlantica* L, *P. vera* L. X *P. terebinthus* L., Serbest tozlaşan *P. vera* L. X

P. vera L. kontrollü tozlaşan *P. vera* L. X *P. vera* L. genotiplerinde sırasıyla % 28.00, 21.33, 12.00 ve 9.33 olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 4.1'de rapor edilen çimlenme değerleri % 72.00 ile 90.66 arasında olduğu görülmüştür. Bu değerler, Antep fıstığına anaç olarak kullanılan *Pistacia khinjuk* melezlerinin yüzey sterilizasyonu oranlarından (% 50-66) daha yüksektir (Çalar 2014).

4.2. Besi Ortamı Tipinin İzole Edilmiş Pistacia Melez Zigotik Embriyolarının İn Vitro Çimlenmesine Etkisi

Dört farklı melez genotipe ait tohumlar Çizelge 4.1 de ifade edildiği gibi yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Melez embriyolar farklı besi ortamlarında kültüre alındı. 21 günlük kültür sonucu çimlenme yüzdesi, gelişen fideciklerin kök ve sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı rapor edildi. Rapor edilen verilere istatistiksel analizler uygulanarak sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Besi ortamı tipinin melez embriyolarının in vitro çimlenmesine etkisi.

Genotip	Uygulama	Çimlenme** ± SH (%)	Kök Uzunluğu** ± SH (cm)	Sürgün Uzunluğu** ± SH (cm)	Yaprak Sayısı**± SH
***P. vera* L. X *P. vera* L. (Serbest tozlaşma)**	MS	100.00 ± 2.22a	0.87 ± 0.21b	1.26 ± 0.03a	7.00 ± 0.40a
	WPM	100.00 ± 2.22a	0.74 ± 0.09b	1.36 ± 0.16a	6.86 ± 0.48a
	SH	86.66 ± 4.44a	2.17 ± 0.11a	1.82 ± 0.13a	6.77 ± 0.10a
***P. vera* L. X *P. vera* L. (Kontrollü ozlaşma)**	MS	98.00 ± 0.00a	1.46 ± 0.69a	1.55 ± 0.19a	6.27 ± 0.23a
	WPM	92.00 ± 3.05a	1.19 ± 0.53a	1.79 ± 0.31a	7.13 ± 0.43a
	SH	90.00 ± 0.00a	1.07 ± 0.17a	2.30 ± 0.30a	8.57 ± 1.82a
***P. vera* L. X *P. terebinthus* L.**	MS	86.66 ± 3.33a	0.61 ± 0.16b	1.33 ± 0.03a	4.66 ± 0.33b
	WPM	90.00 ± 5.00a	0.92 ± 0.20b	1.21 ± 0.15a	5.57 ± 0.17b
	SH	80.00 ± 0.00a	2.20 ± 0.33a	1.31 ± 0.14a	6.00 ± 0.14a
***P. Vera* L. X *P. Atlantica* L.**	MS	90.00 ± 2.00a	0.85 ± 0.10a	1.37 ± 0.12a	5.87 ± 1.12a
	WPM	66.33 ± 2.02b	0.63 ± 0.09a	0.70 ± 0.11a	3.50 ± 0.94a
	SH	80.00 ± 5.77ab	0.99 ± 0.25a	1.27 ± 0.40a	3.71 ± 1.68a

*Veriler kültürün 21. gününde toplam en az 45 embriyonun ortalamasıdır.
**Çizelgede her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVAYI takip eden LSD testine göre $P \leq 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.
SH: Standart sapma

Serbest tozlaşan P. vera L. hibrit embriyolarının üç farklı besi ortamında kültüre alındıktan 21 gün sonra rapor edilen gözlemler Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Çimlenme yüzdesi olarak en iyi sonuç MS ve WPM besi ortamlarında % 100 olduğu halde, SH besi ortamında çimlenme oranı % 86.66 ile en düşük değer ölçülmüştür. Fenotipik özelliklerden kök uzunluğunda ise en iyi sonuç SH besi ortamında 2.17 cm olarak ölçülürken, kök gelişiminin MS ve WPM besi ortamlarında daha zayıf olduğu ve birbirine yakın sonuçlar

verdiği görülmüştür. Sürgün uzunluğu bakımından ise yine kök uzunluğunda olduğu gibi SH besi ortamı 1.82 cm ile en iyi sonuç vermekle beraber üç besi ortamındaki ortalama değerler arasında istatistiki olarak bir fark olmadığı görülmüştür. Yaprak sayısına bakılırsa MS besi ortamı daha iyi sonuç vermekle beraber üç besi ortamında da yine benzer değerler ölçülmüştür. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre serbest tozlaşan *P. vera* L. *X P. vera L.* hibrit embriyoların çimlendirilmesinde MS ve WPM besi ortamları kullanmanın bize daha iyi sonuçlar verdiğini buna karşın sürgün gelişiminde SH besi ortamının kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir. Yaprak sayısının fazla olmasında ise MS besi ortamının daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Kontrollü tozlaşan *P. vera* L. X *P. vera* L. melez embriyolarının üç farklı besi ortamında kültüre alındıktan 21 gün sonra fenotipik özellikler rapor edilmiştir. Buna göre çimlenme yüzdesi olarak en iyi sonucun MS besi ortamında % 98 lik değeri verirken, WPM ve SH ortamlarında ise buna yakın değerler ölçülmüştür. Kök uzunluğunda ise en iyi sonuç MS besi ortamında 1.46 cm ortalama ile ölçülürken, WPM ve SH besi ortamlarında ise sırasıyla 1.19 ve 1.07 cm değerleri ölçülmüştür. Sürgün uzunluğu değerlendirildiğinde SH besi ortamı en yüksek sonucu ortalama 2.30 cm olarak ölçülürken, MS ve WPM de benzer sonuçlar kaydedilmiştir. Ortalama yaprak sayısında ise sürgünde olduğu gibi SH besi ortamında 8.57 olarak ölçülürken, MS ve WPM'de birbirine yakın sonuçlar rapor edilmiştir. Kontrollü tozlaşan *P. vera* L. X *P. vera* L. melez embriyolarının çimlendirilmesi ve kök uzunluğu bakımından MS besi ortamının kullanılmasının daha iyi sonuçlar vereceği tesbit edilirken, sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı bakımında en iyi sonucu SH besi ortamının verdiği gözlenmiştir.

Kontrollü tozlaştırılan *P. vera* L. X *P. terebinthus* L. melez embriyoları üç farklı besi ortamı içeren ortamlarda kültüre alındı. 21 gün süre sonunda gelişen fideciklerin morfolojik gelişimleri incelendi ve rapor edilen değerler istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Buna göre çimlenme yüzdesi bakımından WPM besi ortamı % 90 ile en yüksek sonucu verirken, MS ve SH besi ortamları sırasıyla, % 86.66 ve % 80 çimlenme oranlarını görülmüştür. Ortalama kök uzunluğu bakımından ise en yüksek sonucu 2.20 cm ile SH besi ortamında ölçülmüştür. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından ise üç farklı besi ortamında çok yakın değerler ölçülmüştür. Ancak yaprak sayısı bakımından SH besi ortamının en iyi sonucu verdiği ve bu değerin 6.00 olduğu rapor edilmiştir. *P. vera* L. X *P. terebinthus* L. melez embriyolarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi ve

sürgün uzunluğu bakımında üç farklı besi ortamında yakın sonuçlar elde edilirken, ortalama kök uzunluğu bakımından en iyi sonucun SH besi ortamında 2.20 cm'lik kök uzunluğu ölçülmüş ve yaprak sayısı bakımından ise SH, WPM ve MS besi ortamında sırasıyla, 6.00, 5.57 ve 4.66 ortalama yaprak sayıları rapor edilmiştir. Buna göre bu genotipteki embriyoların *in vitro* çimlendirilmesinde SH besi ortamının etkili olduğu fakat bu durumun daha fazla sayıda tekrarlarla doğrulanması gereklidir.

P. vera L. X *P. atlantica* L. melez embriyoları *in vitro* ortamda üç farklı besi ortamında kültüre alındı ve 21 gün sonra gelişen fideciklerin çimlenme ve morfolojik gelişimleri incelenip istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Buna göre MS besi ortamında % 90 ile en iyi çimlenme yüzdesi elde edilirken, en düşük çimlenme oranı WPM besi ortamında % 66.33 olarak ölçülmüştür. Ortalama kök uzunluğu bakımından SH en iyi sonucu verse de yapılan istatistiki analiz sonucuna göre üç farklı besi ortamında kök uzunluğu bakımından veriler arasında bir farklılık görülmemiştir. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından yine MS besi ortamında 1.37 cm ile en yüksek değer elde edilirken, WPM ve SH besi ortamında ise ortalama sürgün uzunlukları sırasıyla, 0.7 ve 1.27 cm olarak gözlenmiştir. Ortalama yaprak sayısı bakımından ise yine MS besi ortamında 5.87 ile en fazla yaprak elde edilirken, WPM ve SH besi ortamlarında daha düşük değerler gözlenmiştir. *P. vera* L. X *P. atlantica* L. hibrit zigotik embriyoların çimlendirilmesi, sürgün eldesi ve yaprak sayısı bakımında en yüksek sonucu MS besi ortamında elde edildiğinden sonraki deneylerde MS besi ortamının uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.3. MS Besi Ortamı Kuvvetinin İzole Edilmiş Melez Pistacia Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri

İzole edilen zigotik embriyolar farklı kuvvetteki (1/4x, 1/2x, 1x, 2x) MS besi ortamında kültüre alındı. İstatistiksel uygulamalara tabi tutulan verilere ait sonuçlar Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Zigotik embriyoların çimlenme ve gelişmesine MS besi ortamının kuvvetinin etkisi*

Genotip	Uygulama	Çimlenme** ± SH (%)	Kök Uzunluğu** ± SH (cm)	Sürgün Uzunluğu** ± SH (cm)	Yaprak Sayısı**± SH
P. vera L. X P. vera L. (Serbest tozlaşma)	MS ¼	80.00 ± 1.01b	1.15 ± 0.10b	1.62 ± 0.10a	7.41 ± 0.20ab
	MS ½	80.00 ± 0.14b	1.68 ± 0.21ab	1.81 ± 0.07a	9.16 ± 0.89a
	MS 1	86.66 ± 0.93a	2.35 ± 0.15a	1.72 ± 0.11a	6.66 ± 0.45ab
	MS 2	53.33 ± 0.93c	1.01 ± 0.27b	1.36 ± 0.19a	5.13 ± 1.07b
P. vera L. X P. vera L. (Kontrollü tozlaşma)	MS ¼	73.00 ± 1.52b	1.33 ± 0.49a	1.92 ± 0.29a	6.77 ± 1.26a
	MS ½	86.66 ± 1.66a	0.96 ± 0.27a	2.26 ± 0.07a	7.80 ± 0.74a
	MS 1	90.00 ± 2.00a	1.07 ± 0.17a	2.30 ± 0.30a	9.07 ± 2.32a
	MS 2	70.00 ± 2.00b	0.73 ± 0.16a	2.23 ± 0.36a	8.07 ± 2.32a
P. vera L. X P. terebinthus L.	MS ¼	73.33 ± 1.81b	0.60 ± 0.26b	1.08 ± 0.03b	4.36 ± 0.76ab
	MS ½	73.33 ± 1.10b	1.38 ± 0.32ab	1.62 ± 0.15a	5.65 ± 0.86ab
	MS 1	80.00 ± 0.72a	2.54 ± 0.63a	1.31 ± 0.10ab	6.00 ± 0.52a
	MS 2	53.33 ± 1.10c	0.90 ± 0.33ab	1.05 ± 0.11b	3.35 ± 0.08b
P. vera L. X P. atlantica L.	MS ¼	80.00 ± 0.44a	1.02 ± 0.20a	1.62 ± 0.17a	6.08 ± 0.67a
	MS ½	66.66 ± 2.61b	1.02 ± 0.08a	0.55 ± 0.13a	5.41 ± 1.00a
	MS 1	80.00 ± 0.44a	1.22 ± 0.30a	1.27 ± 0.36a	3.71 ± 1.70a
	MS 2	46.66 ± 3.19c	0.75 ± 0.23a	1.50 ± 0.25a	4.83 ± 0.30a

*Veriler kültürün 21. gününde toplam en az 75 embriyonun ortalamasıdır.**Çizelgede her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre $P \leq 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. SH: Standart sapma

İstatistiksel analiz sonucuna göre serbest tozlaşan *P.vera* L. x *P.vera* L. melez embriyolarının çimlenmesi ve morfolojik gelişimi üzerine denenen dört farklı kuvvetteki besi ortamları içerisinde en yüksek çimlenme oranı ortalama % 86.66 ile 1x kuvvetindeki MS'de ve en düşük çimlenme %53.33 oranı ile 2x kuvvetindeki MS besi ortamında gözlenmiştir. Bu genotipte test edilen diğer iki besi ortamında çimlenme oranları %80 olarak rapor edilmiştir. Bu genotipte ortalama kök uzunlukları çimlenme oranlarına benzer bir gelişme göstermiştir. 21 günlük kültür sonucunda 1x kuvvetindeki MS besi ortamında gelişen bitkiciklerin ortalama kök uzunluğu 2.35 cm olarak rapor edilmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından gelişen bitkicikler en fazla 1.81 cm ile 1/2x kuvvetindeki MS besi ortamında görülürken, en düşük ortalama sürgün uzunluğu 1.36 cm ile 2x MS kuvvetindeki besi ortamında gözlenmiştir. Ancak istatistiksel analiz sonuçlara göre ortalama sürgün uzunluğu bakımından test edilen besi ortamı kuvvetleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Bu genotipte

ortalama kök uzunlukları çimlenme oranlarına benzer bir gelişme göstermiştir. Bu genotipte ortalama en fazla yaprak sayısı bakımından; 9.16 ile 1/2x kuvvetindeki MS besi ortamında elde edilirken, en az yaprak sayısı ise 5.13 ile MS 2x besi ortamında rapor edilmiştir. Sonuç olarak, bu genotipin embriyolarının *in vitro* çimlenmesi ve morfolojik gelişimi üzerine rapor edilen bütün parametreler (çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, yaprak sayısı) 2x kuvvetindeki MS besi ortamının bu genotipin çimlendirilmesi ve gelişimini azalttığı; çimlenme yüzdesi ve kök uzunluğu bakımından 1x kuvvetindeki MS besi ortamının en iyi sonuçları verdiği; sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı bakımından ise en yüksek sonuçların 1/2x MS besi ortamında rapor edilmiştir. Bu sonuçlar gösteriyor ki melez kökenli embriyolardan fazla sayıda sürgün çoğaltmak için, embriyolar 1/2x kuvvetindeki MS besi ortamında çimlendirilmesinin uygun olduğu, ancak daha yüksek oranda çimlenme yüzdesi ve daha iyi kök gelişimi gösteren bitkicikler geliştirdiği için 1x kuvvetindeki MS besi ortamının kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Kontrollü tozlaşan *P.vera* L.x *P.vera* L. melez embriyoların çimlenmesi ve morfolojik gelişimleri üzerinde denenen dört farklı MS kuvvetleri içerisinde en yüksek çimlenme oranı % 90 ile 1x kuvvetindeki MS besi ortamında görülürken, en düşük oran ise % 70.00 ile 2 x MS besi ortamında rapor edilmiştir. Bu genotipte test edilen diğer iki besi ortamında çimlenme oranları %73 ve %86 olarak rapor edilmiştir. Bu genotipte 21 günlük kültür ortamında gelişen bitkicikler içerisinde ortalama en uzun kök gelişimi 1.33 cm ile 1/4x MS kuvvetindeki besi ortamında elde edilirken, en düşük ortalama kök uzunluğu 0.73 cm ile 2x MS kuvvetindeki ortamda test edilmiştir. Çizelge 4.3.'te verilen sonuçlara benzer şekilde Abosalim vd. (1992)'ne göre düşük kuvvetteki besi ortamlarında antep fıstığı bitkiciklerinin gelişimini teşvik ettiği rapor edilmiştir. Ancak Çizelge 4.2.'de sunulan verilere göre test edilen üç besi ortamı içerisinde en homojen fide gelişiminin 1x MS kuvvetinde besi ortamında olduğu Benmahioul vd. (2009) antepfıstığının zigotik embriyolarının *in vitro* çimlendirilmesi ve sürgünlerin çoğaltılması çalışmasında da rapor edilmiştir. Ancak ortalama sürgün ve kök uzunlukları bakımından dört farklı MS besi ortamında rapor edilen değerler arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. Her iki parametrede de 1/4x MS besi ortamındaki değerler diğerlerine göre daha yüksek değerler rapor edilmiştir. Bu kapsamda kontrollü tozlaştırılmış *P. vera* L. x *P. vera* L. melez embriyolarının *in vitro*

çimlendirilmesi ve gelişimi için en iyi sonuçlarının 1x MS ortamında elde edildiği görülmüştür.

P.vera L x *P.terebinthus* L. melez embriyolarının farklı kuvvetteki MS ortamlarında çimlenme ve morfolojik gelişimleri üzerindeki etkilerine bakıldığında; çimlenme yüzdesi bakımından en iyi sonuç % 80 ile 1x MS kuvvetindeki besi ortamında görülürken, en düşük sonuç ise % 53.33 ile 2x MS kuvvetindeki besi ortamında elde edilmiştir. Bununla birlikte 1/4x ve 1/2x MS kuvvetlerindeki besi ortamında aynı çimlenme yüzdesi olduğu görülmüştür. 21 günlük kültür ortamında gelişen fidelerin ortalama kök uzunluğuna bakıldığında en yüksek sonuç 2.54 cm ile 1x MS kuvvetteki besi ortamında gözlenmiştir. Ancak 1x MS kuvvetinde gelişen embriyolar ile 1/2x ve 2x MS kuvvetlerinde gelişen embriyolarda istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. En düşük ortalama kök uzunluğu 0.6 cm ile 1/4x MS kuvvetindeki besi ortamında ölçülmüştür. *P.vera* L x *P.terebinthus* L. melezinin sürgün uzunlukları değerlendirildiğinde 1.62 cm ile 1/2x MS kuvvetindeki besi ortamında en iyi sonucu verirken, en düşük sonuç 1.05 cm ile 2x MS kuvvetindeki besi ortamında ölçülmüştür. Ortalama yaprak sayısı bakımından değerlendirildiğinde ise 1x MS kuvvetindeki besi ortamında ortalama 6.00 iken en düşük ortalama yaprak sayısı 3.35 ile 2X MS kuvvetinde görülmüştür. Bu rakamlara göre *P. vera* L x *P. terebinthus* L. melez embriyolarının *in vitro* çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve yaprak sayısı bakımından en iyi sonuçlar 1x MS kuvvetindeki besi ortamında gözlenmiştir.

P. vera L. x *P. atlantica* L. melez embriyolarının *in vitro* çimlenme ve fenotipik özellikleri değerlendirildiğinde; en yüksek çimlenme yüzdesi bakımından 1/4x ve 1x MS kuvvetindeki besi ortamında % 80 olarak gözlenirken, en düşük oran % 46.66 ile 2x MS kuvvetinde olduğu gözlenmiştir. Bu genotipte ortalama kök uzunluğu bakımından dört farklı MS kuvvetinin birbirine yakın sonuç verdiği fakat en yüksek ortalama kök uzunluğu 1.22 cm ile 1x MS kuvvetinde görülmüştür. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından ise en yüksek değer 1.62 cm ile 1/4x MS kuvvetinde besi ortamında elde edilmekle beraber test edilen diğer besi ortamı kuvvetindeki sonuçlarla istatistiki olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Bu genotipte ortalama yaprak sayısı bakımından sonuçlar sürgün uzunluğuna paralel olduğu gözlenmiştir.

4.4. Karbonhidrat Çeşidinin İzole Edilmiş Melez *Pistacia* Genotipi Zigotik Embriyolarının İn Vitro Çimlenmesine Etkisi

Dört farklı melez genotipe ait tohumlar Çizelge 4.1 de ifade edildiği gibi yüzey sterilizasyona tabi tutulduktan sonra izole edilen zigotik embriyolar 30 g/lt glikoz ve sükroz içeren MS besi ortamlarına ayrı ayrı kültüre alındı. İstatistiksel uygulamalara tabi tutulan verilere ait sonuçlar Çizelge 4.4 te verilmiş.

Çizelge 4.4. Karbonhidrat çeşidinin izole edilmiş Pistacia cinsi zigotik embriyolarının in vitro çimlenmesine etkisi*

Genotip	Uygulama	Çimlenme** ± SH (%)	Kök Uzunluğu** ± SH (cm)	Sürgün Uzunluğu** ± SH (cm)	Yaprak Sayısı**± SH
***P. vera* L. X *P. vera* L. (Serbest tozlaşma)**	Sükroz	86.66 ±3.00 a	1.61±0.23 a	1.82 ±0.03 ab	6.77±0.52 ab
	Glikoz	83.33 ±2.86 a	0.92±1.33 a	1.75 ±0.28 ab	8.66 ±0.60 a
***P. vera* L. X *P. vera* L. (Kontrollü. tozlaşma)**	Sükroz	86.66 ±3.00 a	1.28 ±0.16 a	2.36 ±0.23 a	8.86±1.21 a
	Glikoz	83.33 ±2.86 a	5.45 ±3.53 a	2.50 ±0.50 a	7.91 ±0.99 a
***P. vera* L. X *P. terebinthus* L.**	Sükroz	83.33 ±3.81 a	2.29 ±0.29 a	1.31 ±0.17 b	6.00 ±0.40 ab
	Glikoz	76.66 ±4.40 a	0.65 ±1.06 a	1.58± 0.04 ab	4.77 ±0.43 b
P. Vera L. X *P. Atlantica* L.	Sükroz	76.66 ±3.00 a	1.22 ±0.36 a	1.27 ±0.25 b	3.71 ±1.40 b
	Glikoz	70.00.±4.40 a	0.61 ±1.14 a	1.05 ±0.22 b	5.03 ±0.53 b

*Veriler kültürün 21. gününde toplam en az 30 embriyonun ortalamasıdır. **Çizelgede her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre $P \leq 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. SH: Standart sapma

P. vera L. X *P. vera* L. (serbest tozlaşma) hibrit embriyolar MS içeren besi yerine farklı tipte karbonhidrat içeren ortamlarda fenotipik özellikler incelenmiştir. Çimlenme yüzdesi olarak bir disakkarit olan sükroz ortamında % 80 çimlenme gözlenmiştir. Kök uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde çalışılan dört melez genotipten üçünde sükrozlu ortam kök gelişimini daha iyi desteklerken sadece *P.vera* L. x *P.vera* L. kontrollü tozlaştırılmış melezlerde glikoz daha iyi sonuç vermiştir. Çalışılan genotipler arasında sürgün uzunluğu en yüksek 2.5 cm ile *P.vera* L x *P.vera* L. kontrollü tozlaşan melezden elde edilmiştir. Çalışılan melez genotiplere arasından sürgün uzunluğu bakımında en düşük glikoz ortamında (1.05 cm) *P.vera* L. x *P.atlantica* L. genotipinde gelişme görülmüştür. Karbonhidrat çeşidinin embriyodan gelişen fidelerde yaprak sayısı bakımında en yüksek değer 30 g / sükroz ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan 8.86 ile kontrollü tozlaşmış *P.vera* L x *P.vera* L. genotipinden elde edilmiştir. En düşük yaprak sayısında 3.71 ile sükrozla destekli MS besi ortamında kültürü alınan *P.vera* L. x *P.atlantica* L. embriyolarında elde edilmiştir.

4.5. BBD'lerinin Melez Pistacia Genotiplerinin İzole Edilmiş Zigotik Embriyolarının *İn Vitro* Çimlenmesine Etkileri

Dört farklı melez genotipin tohumlarından izole edilen embriyolar bir kontrol grubu ile birlikte dört farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besi yeri ortamında kültüre alınarak 21 günlük kültür süresi sonunda rapor edilen veriler analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.5'de sunuldu.

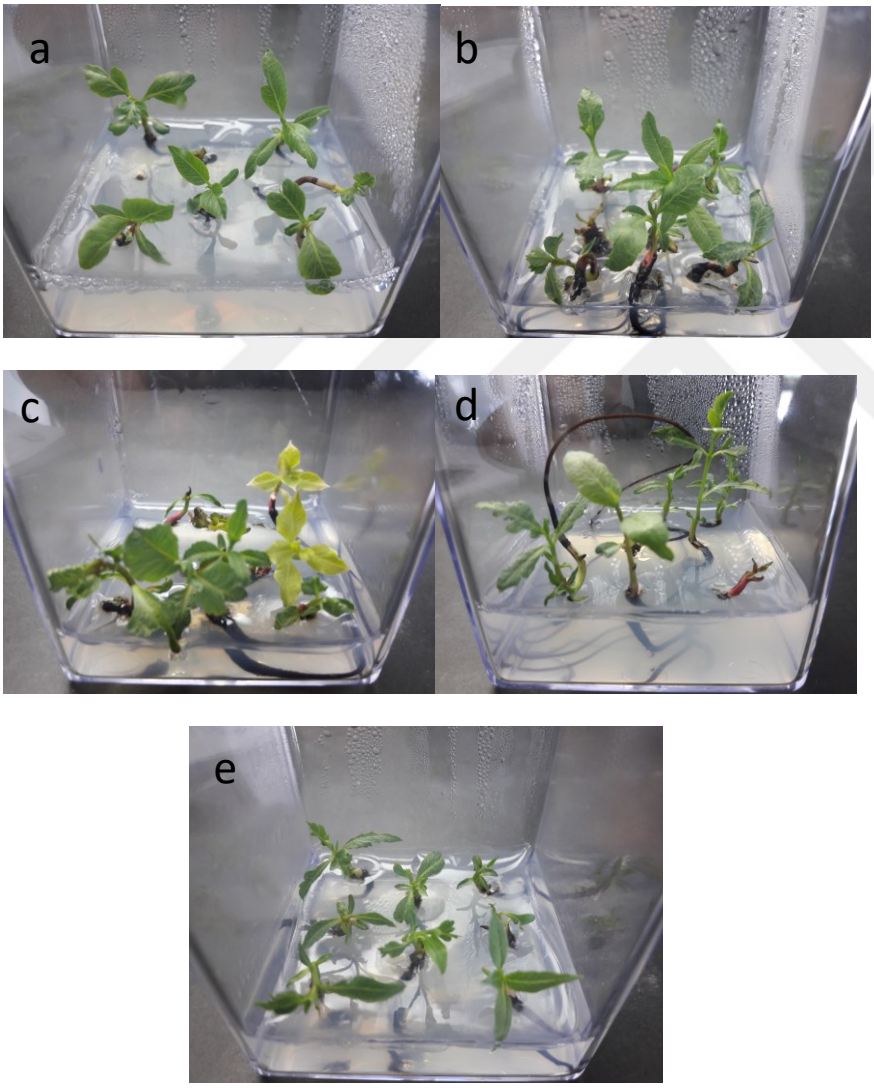
Çizelge 4.5. Melez Pistacia genotiplerinin izole edilmiş embriyolarının in vitro çimlenmesine BBD'lerinin etkileri*

Genotip	Uygulama	Çimlenme** ± SH (%)	Kök Uzunluğu** ± SH (cm)	Sürgün Uzunluğu** ± SH (cm)	Yaprak Sayısı**± SH
P. vera L. X P. vera L. (Serbest tozlaşma)	Kontrol	86.66 ±1.33ab	2.81 ±0.24a	1.82 ± 0.16a	6.50 ± 0.06 a
	NAA	92.00 ±3.97ab	1.46 ±0.76 a	1.01 ± 0.16b	5.41 ± 0.70 a
	IBA	81.66 ±2.10b	2.69 ±0.29 a	1.77 ± 0.24a	6.33 ± 0.41 a
	BA	93.33 ±0.46a	2.10 ±0.46a	1.47 ± 0.12ab	6.41 ± 0.39 a
	KİN	96.66 ±4.52a	2.94±0.49a	1.83 ± 0.22a	5.53 ± 0.11a
P. vera L. X P. vera L. (Kontrollü tozlaşma)	Kontrol	90.00 ±5.00b	1.07 ± 0.17bc	2.30 ± 0.30a	9.07 ± 2.32a
	NAA	73.33 ±1.66c	3.76 ± 0.14a	2.98 ± 1.00a	8.28 ± 0.88a
	IBA	80.00 ± 2.88c	1.72 ± 0.11c	2.71 ± 0.75a	7.83 ± 1.43a
	BA	80.00 ±0.00c	0.96 ± 0.26c	2.52 ± 0.61a	8.30 ± 1.45a
	KİN	98.66 ± 1.33a	2.15 ± 0.67b	2.00 ± 0.52a	7.23 ± 1.21a
P. vera L. X P. terebinthus L.	Kontrol	80.00 ± 2.88b	2.62 ± 0.68a	1.31 ± 0.14ab	6.00 ± 0.14a
	NAA	98.33 ± 1.66a	1.88 ± 0.21a	1.13 ± 0.04ab	3.44 ± 0.70b
	IBA	97.50 ± 2.50a	2.88 ± 1.31a	0.96 ± 0.09b	4.90 ± 0.10ab
	BA	98.33 ± 1.66a	1.27 ± 0.17a	1.24 ± 0.18ab	5.57 ± 0.63a
	KİN	85.66 ± 4.33b	2.96 ± 0.62a	1.45 ± 0.11a	5.08 ± 0.79ab
P. Vera L. X P. Atlantica L.	Kontrol	80.00 ± 0.00a	1.22 ± 0.46ab	1.27 ± 0.40ab	3.71 ± 1.68a
	NAA	60.00 ± 2.88c	1.10 ± 0.45ab	0.61 ± 0.11b	3.02 ± 0.52a
	IBA	60.00 ± 0.00c	2.40 ± 0.40a	1.43 ± 0.06ab	5.04 ± 0.29a
	BA	69.75 ± 3.42b	1.10 ± 0.35b	1.22 ± 0.24ab	4.58 ± 0.93a
	KİN	60.00 ± 2.88c	1.24 ± 0.04ab	1.75 ± 0.38a	5.27 ± 1.01a

*Veriler kültürün 21. gününde toplam en az 75 embriyonun ortalamasıdır.**Çizelgede her bir genotipe ait kolonda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların ANOVAYI takip eden LSD testine göre $P \leq 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. SH: Standart sapma

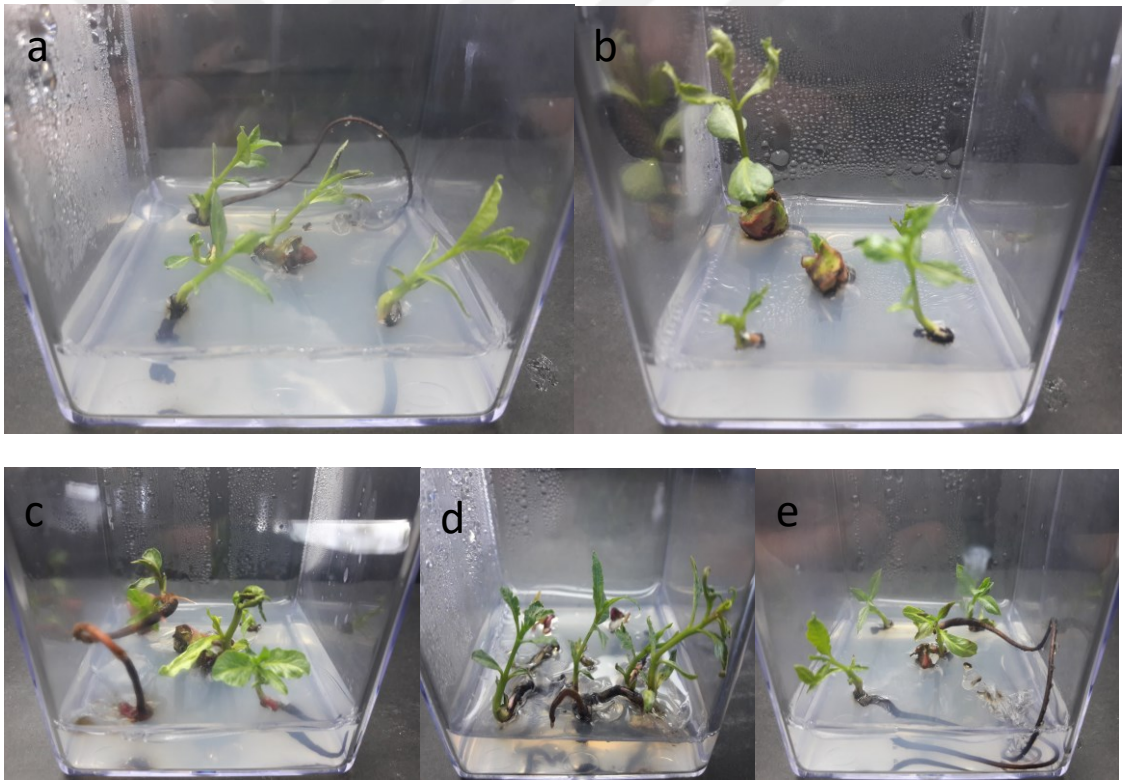
P. vera L. X *P. vera* L. (serbest tozlaşma) melez genotipe ait embriyoların in vitro ortamda çimlenme yüzdesi olarak en iyi gelişim KİN içeren MS besi ortamında %96.66 olarak rapor edildi. Kontrol ve NAA içeren ortamlarda birbirine yakın çimlenme oranları verirken, en düşük çimlenme % 81.66 olarak IBA destekli MS içeren ortamda gözlenmiştir. Test edilen bütün parametrelerde gözlenen kök uzunlukları arasında istatiksel bir farklılık olmadığı ve NAA destekli besi ortamında en düşük kök uzunluğu (1.46 cm) ölçülürken en yüksek değer 2.94 cm ile KİN destekli besi ortamında rapo edilmiştir.

Sürgün uzunluğu bakımından kontrol ve KİN içeren ortamda sırasıyla 1.82 ve 1.83 olarak rapor edilmiştir. Sürgün uzunluğun en kısa olduğu ortamın ise 1.01 cm ile NAA da destekli besi ortamında rapor edilmiştir. Yaprak sayısı bakımından en iyi gelişim Kontrol grubu olsada bütün ortamlarda yaprak sayısı birbirine çok yakındır ve gruplar arasında istatiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Bu değerlere bakılınca *P. vera* L. X *P. vera* L. (serbest tozlaşma) hibrit genotipinin çimlenme yüzdesi kök ve sürgün uzunluğunun en iyi gelişim MS besi yerinde KİN içeren besi ortamın daha uygun olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.).



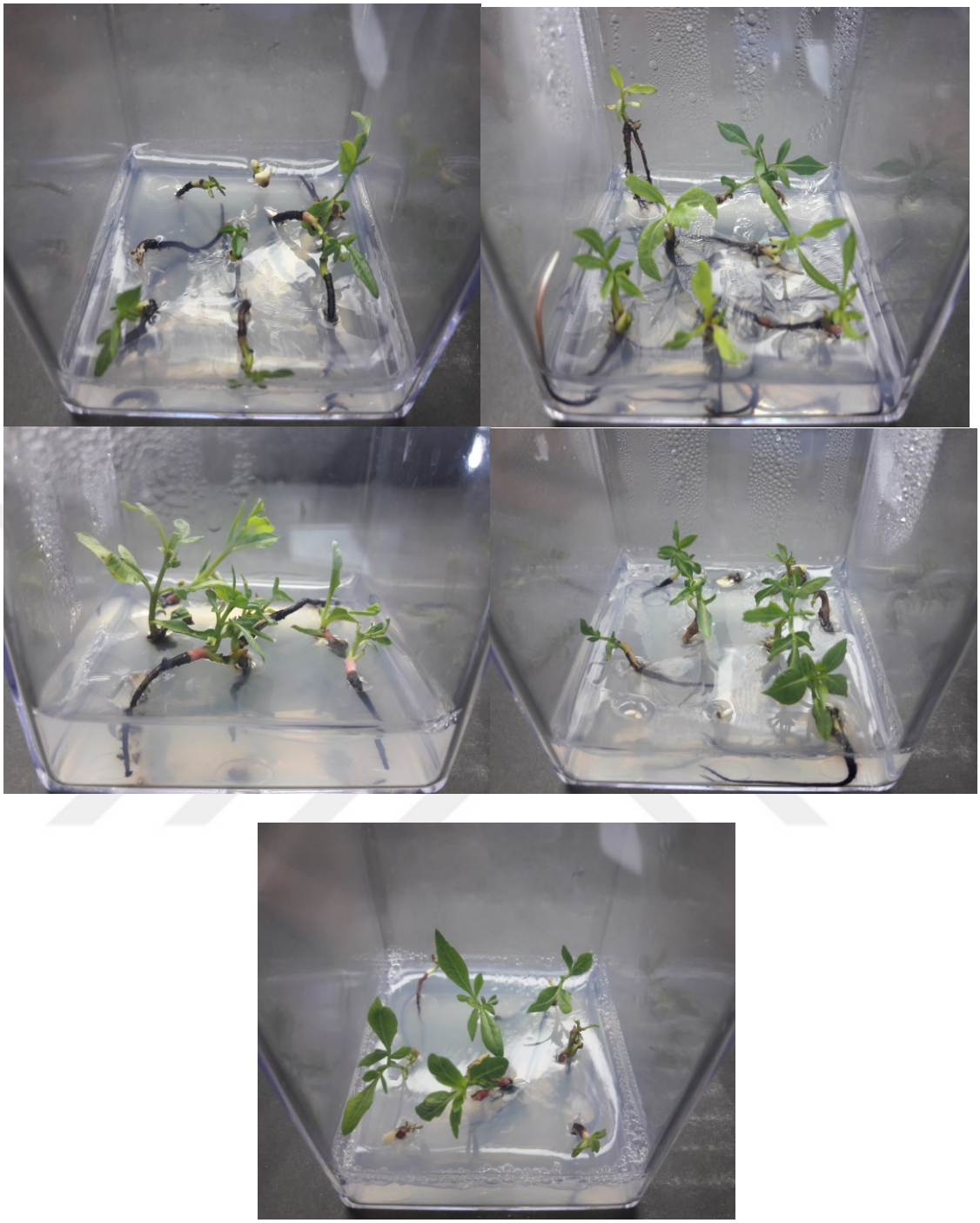
Şekil.4.1. *P.vera* x *P.vera* (serbest tozlaşan) bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi (**a)** kontrol grubu, **b)** 1g/l Kin, **c)** 1 g/l BA, **d)** 1 g/l IBA **e)** 1g/l NAA)

P. vera L. X *P. vera* L. (kontrollü tozlaşma) hibrit antepfıstığı embriyolarının MS içeren ortamda çimlenme yüzdesi olarak *P. vera L.* X *P. vera* L. (serbest tozlaşma) da olduğu gibi KİN destekli besi ortamında en yüksek oran (% 98.66) ölçülürken en düşük çimlenmenin % 73.33 olarak NAA destekli besi ortamlarında rapor edildi. IBA ve BA içeren ortamlarda ise %80.00 olduğu rapor edildi. Kök uzunluğu bakımından MS içeren besi yerinde BBD içeren ortamlardan NAA destekli besi ortamında 3.76 cm ile en yüksek uzunluk ölçülmüştür. En kısa uzunluk ise BA destekli besi ortamında 0.96 cm olduğu görüldü. Sürgün uzunluğu bakımından kök uzunluğunda olduğu gibi en yüksek uzunluk NAA içeren ortamda ölçülsede diğer hormon içeren ortamlarda da yaklaşık değerler ölçülmüşür. MS besi ortamında dört farklı hormon içeren ortamlarda yaprak sayısı yaklaşık birbirine yakın değerlerdedir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *P.vera* x *P.vera* (kontrollü tozlaşan) bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi (**a)** 1 g/l NAA, **b)** kontrol grubu, **c)** 1 g/l IBA **d)** 1 g/l BA **e)** 1 g/l KİN)

P. vera L. X *P. terebinthus* L. hibrit tohumlarından izole edilen embriyoların MS besi ortamı içeren *in vitro* ortama ekilmesi sonucu gözlenen fenotiplerden biri olan çimlenme yüzdesi olarak NAA ve BA hormanlarının bulunduğu ortamda en iyi çimlenme gözlenmiş ve bu değerin yaklaşık % 98 olduğu tesbit edilmiştir. Buna karşın en az çimlenmenin kontrol grubunda %80 olduğu görülmüştür. Yine gözlenen fenotipik özelliklerden olan kök uzunluğunun en iyi olduğu ortam 2.96 cm ile KİN olmakla birlikte diğer dört ormanda yaklaşık değerler tesbit edilmiştir. Sürgünlerin uzunluğuna bakıldığında yine KİN içeren ortamda en iyi gelişimle 1.45 cm ölçülmüştür. IBA hormonu içeren ortamın 0.96 cm ile en kısa sürgün verdiği rapor edilmiştir. Yaprak sayısı bakımından hormonların etkisi incelendiğinde ise kontrol grubunda 6 tane ile en yüksek değer ölçülsede BA ortamında da kontrol grubuna yakın değer ölçülmüştür. NAA hormonlu ortamında en düşük değer olan 3.44 ölçülmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *P.vera* x *P.terebinthus* bitkilerinde MS besi ortamında BBD'lerin etkisi

(a) 1g/l NAA, b) 1g/l IBA, c) 1g/l BA, d) 1g/l KİN e) kontrol grubu)

P. vera L. X *P. atlantica* L. antepfıstığı melez tohumlarından elde edilen zigotik embriyoların MS besi ortamına ekilmesiyle çimlenme yüzdesi oranında en iyi sonucu veren ortamın %80 ile kontrol grubu olduğu buna karşılık en düşük değerin NAA, IBA ve KİN içeren ortamlarda ise % 60 çimlenme olduğu görülmüştür. Fenotipik özelliklerden bir diğeri olan kök uzunluğu bakımından en iyi sonuç 2.40 cm ile IBA içeren ortam olmakla birlikte kontrol, NAA ve KİN içeren MS li ortamlarda birbirine yaklaşık değerler görülmüştür. Sürgün uzunluğu bakımından ise en iyi sonuç KİN içeren ortamda ve 1.75 cm olarak rapor edilmiştir. Kontrol, IBA ve BA hormonlarını içeren MS besi ortamlarında değerler yaklaşık olarak benzerlik göstermekle birlikte en düşük değer 0.61 cm ile NAA içeren ortam olmuştur. Yaprak sayısı olarak sürgün uzunluğunda olduğu gibi en iyi değer KİN içeren ortamda 5.27 olarak ölçüldü. Buna karşılık en düşük değer ise NAA içeren ortamda ve 3.02 olarak rapor edildi

4.6 *Pistacia vera* L. *X Pistacia atlantica* L. hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Çizelge 4.6 ve 4.7 de *P. vera* L. X *P. atlantica* L. hibriti için ISSR ve IRAP belirteçlerinin ayrımlama kapasiteleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *P. vera* L. X *P. atlantica* L. hibritlerinde ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
ISSR-1	5	5	10	0.5	1.111	0.5556	0.163
ISSR-2	9	1	10	0.9	1.111	1	0.3556
ISSR-4	7	3	10	0.7	1.111	0.7778	0.242
ISSR-5	3	3	6	0.5	0.6667	0.3333	0.03292
ISSR-6	3	4	7	0.43	0.7778	0.3344	0.1058
ISSR-7	6	1	7	0.86	0.7778	0.6689	0.1905
ISSR-8	4	6	10	0.4	1.111	0.4444	0.1877
ISSR-9	3	3	6	0.5	0.6667	0.3333	0.1975
ISSR-10	0	3	3	0	0.3333	0	0
Toplam	40	29	69				
Ortalama	4.444	3.222	7.667	0.5322	0.8519	0.4942	0.1639

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

ISSR primerleri kullanılarak her bir primerin polimorfizm oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 69 bant elde edilmiştir. Değerlendirilen primerlerden polimorfizm oranında en az 3, en fazla 10 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 7.6 olarak tespit edilmiştir. Bitki büyüme

düzenleyicisi içermeyen ortamda yetiştirilen bitkiler (Kontrol grubu), 4 farklı BBD'den birini içeren ortamlarda büyütülen klonlar ile karşılaştırıldığında, toplamda oluşan 69 banttan 40'ının polimorfik olduğu (%57.97) belirlenmiştir. En fazla polimorfizm oranı, **ISSR-2** primeri ile (% 90) amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm (%0) **ISSR-10** primeri ile elde edilmiştir. Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında en çok polimorfik bant veren birey sayısı **ISSR-2** primerinde elde edilmiş olup (PIC: 0.3556), tüm primerlerin ortalama PIC değeri 0.1639 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Rapor edilen literatüre göre, Botstein ve ark. (1980), 0.250'nin üzerindeki PIC sonucunun, polimorfizmde eşik değeri olduğunu rapor etmiştir.

Çizelge 4.7. *P. vera* L. X *P. atlantica* L. klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
IRAP-2	4	2	6	0.67	0.6667	0.4467	0.2551
IRAP-4	6	1	7	0.86	0.7778	0.6689	0.2892
IRAP-5	6	1	7	0.86	0.7778	0.6689	0.3104
AYF	8	2	10	0.8	1.111	0.8889	0.2667
TMS	3	2	5	0.6	0.5556	0.3333	0.1481
Toplam	27	8	35				
Mean	5.4	1.6	7	0.758	0.7778	0.6013	0.2539

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

IRAP primerleri kullanılarak her bir belirtecin polimorfizm oranları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 35 bant elde edimiştir. Değerlendirilen markırlardan en az 5, en fazla 10 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 7 olarak tespit edilmiştir. 5 primerden elde edilen bantların ortalama polimorfizm oranı ise %77.14'tir. En fazla polimorfizm oranı, **IRAP-4 ve IRAP-5** primeri ile (% 85.71) amplifikasyonunda ortaya çıkarken, en düşük polimorfizm **TMS** primeri ile elde edilmiştir (%66.66). Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği, **IRAP-4 ve IRAP-5** primerleri ile elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla, 0.2892 ve 0.3104'tür. IRAP primerlerinin ortalama PIC değeri 0.2539 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Elde edilen ortalama PIC değeri, 0.25 ile 0.5

arasında olması klonlar ile kontrol grubu arasındaki polimorfizmin makul bir oranda olduğunu göstermektedir (Botstein ve ark. 1980).

Çizelge 4.8. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

BBD Tipi	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.69	1							
BA2	0.68	0.91	1						
KIN1	0.69	0.75	0.73	1					
KIN2	0.66	0.72	0.68	0.84	1				
IBA1	0.6	0.85	0.9	0.68	0.66	1			
IBA2	0.6	0.83	0.88	0.68	0.66	0.95	1		
NAA1	0.6	0.77	0.82	0.71	0.66	0.79	0.8	1	
NAA2	0.6	0.77	0.78	0.68	0.65	0.79	0.83	0.86	1

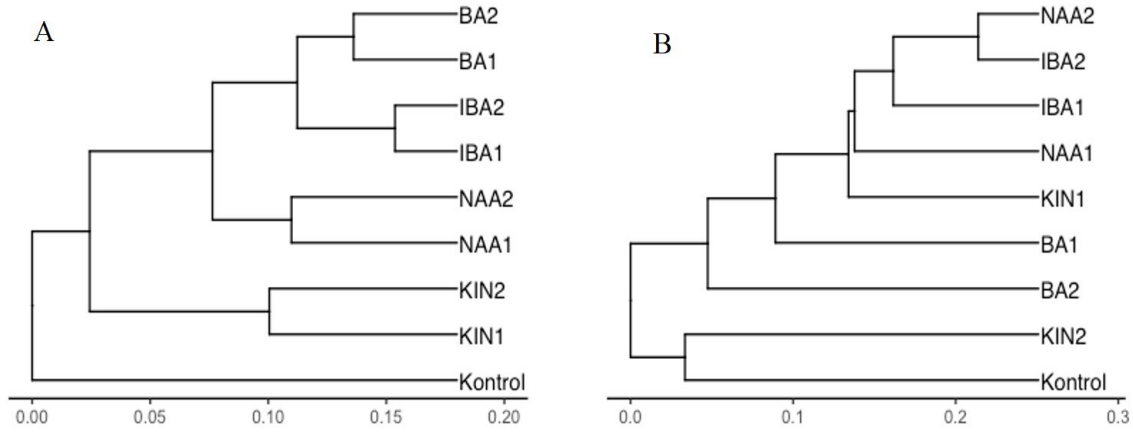
P. vera L. × *P. atlantica* L. hibritine ait ISSR markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.8) ve dendogram (Şekil 4.4) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.6 ile 0.69 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (%69) BA1 ve KIN1 klonlarıyken, en uzak klonlar (%60) IBA1 ve IBA2 ile NAA1 ve NAA2 klonları olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.95 (IBA1 ve IBA2), en düşük ise 0.65'tir (KIN2 ve NAA2) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.9. *P. vera* × *P. atlantica* hibritinde IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

BBD Tipi	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.48	1							
BA2	0.57	0.67	1						
KIN1	0.48	0.63	0.6	1					
KIN2	0.57	0.48	0.5	0.48	1				
IBA1	0.48	0.62	0.54	0.74	0.48	1			
IBA2	0.47	0.71	0.63	0.78	0.52	0.82	1		
NAA1	0.5	0.7	0.56	0.77	0.5	0.75	0.79	1	
NAA2	0.52	0.71	0.57	0.78	0.52	0.82	0.93	0.79	1

P. vera L. × *P. atlantica* L. hibritine ait IRAP markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.9) ve dendogram (Şekil 4.4) incelendiğinde, kontrol grubu

ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.47 ile 0.57 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 57) ile BA2 ve KIN2 klonlarıyken, en uzak klonun ise (% 47) IBA2 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.93 (NAA2 ve IBA2), en düşük ise 0.48'dir (KIN2 ve IBA1, KİN2 ve BA1, KİN1 ve KİN2)(Çizelge 4.9).



Şekil 4.4. A;ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram B; IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram

Şekil 4.4 A'da Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın *P. vera* × *P. atlantica* BBD'li (hormonlu ortam) hibriti KİN1 ve KİN2 olurken en uzak genotip ise BA2 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin BA1 ve BA2 iken en uzak iki BBD'li hibrit KİN1 ve BA2 olmuştur.

Şekil 4.4. B'de ise *P. vera* × *P. atlantica* BBD'li (hormonlu ortam) hibritlerinin kontrolden en uzak BBD'li hibriti IBA2 olduğu görülürken, en yakın KİN2 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin IBA2 ve NAA2 iken en uzak iki BBD'li hibrit KİN2 ve NAA2 olmuştur.

Çizelge 4.10'da belirteç sistemleri arasındaki korelasyon değeri gösterilmektedir.

Çizelge 4.10. Mantel korelasyon testi (p<=0.05)

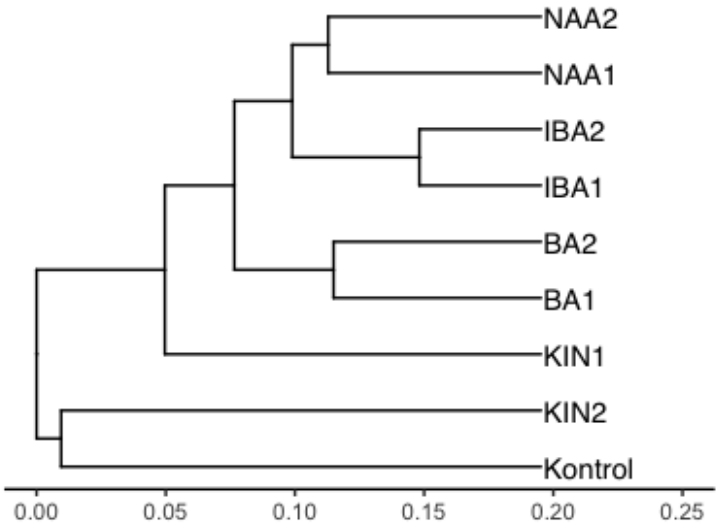
Korelasyon	P	Sig	Permutasyon
0.4901	0.02797	TRUE	1000

Çizelge 4.11'de birleştirilmiş belirteç sistemi ile elde edilen Jaccard benzerlik matiris, Şekil 4.5'de ise Jaccard farklılık indisi ile elde edilmiş dendrogram görülmektedir.

Çizelge 4.11. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi

BBD Tipi	**Kontrol**	**BA1**	**BA2**	**KIN1**	**KIN2**	**IBA1**	**IBA2**	**NAA1**	**NAA2**
Kontrol	1								
BA1	0.62	1							
BA2	0.65	0.84	1						
KIN1	0.61	0.71	0.69	1					
KIN2	0.63	0.64	0.62	0.7	1				
IBA1	0.56	0.78	0.78	0.7	0.6	1			
IBA2	0.56	0.79	0.8	0.71	0.61	0.91	1		
NAA1	0.57	0.75	0.74	0.73	0.61	0.78	0.8	1	
NAA2	0.57	0.75	0.72	0.71	0.61	0.8	0.86	0.84	1

P. vera L. × *P. atlantica* L. hibritine ait ISSR ve IRAP markırları kullanılarak birleştirilmiş belirteç Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.11) ve dendogram (Şekil 4.5) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.57 ile 0.65 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (%65) BA2 klonuyken, en uzak klonlar (%56) IBA1 ve IBA2 klonları olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.91 (IBA1 ve IBA2), en düşük ise 0.6'tir (KIN2 ve IBA1) (Çizelge 4.11).



Şekil 4.5. Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram

Şekil 4.5 de Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın *P. vera* × *P. atlantica* BBD'li (hormonlu ortam) hibriti KİN2 olurken en uzak genotip ise NAA2 hibriti olmuştur. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibrit NAA2 ve NAA1 iken en uzak iki BBD'li hibrit KİN2 ve NAA2 olmuştur.

4.7. *Pistacia vera* L. *X Pistacia terebinthus* L. hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Çizelge 4.14 ve 4.15'de *P. vera X P. terebinthus* klonları için ISSR ve IRAP belirteçlerinin ayrımlama kapasiteleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. *P. vera* L. *X P. terebinthus* L. klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
ISSR-1	6	3	9	0.67	1	0.67	0.225
ISSR-2	6	2	8	0.75	0.8889	0.6667	0.2531
ISSR4	4	3	7	0.57	0.7778	0.4433	0.1693
ISSR-5	0	3	3	0	0.3333	0	0
ISSR-6	3	5	8	0.38	0.8889	0.3378	0.179
ISSR-7	1	4	5	0.2	0.5556	0.1111	0.06914
ISSR-8	9	4	13	0.69	1.444	0.9967	0.2963
ISSR-9	2	5	7	0.29	0.7778	0.2256	0.09171
ISSR-10	0	3	3	0	0.3333	0	0
Toplam	31	32	63				
Mean	3.444	3.556	7	0.3944	0.7778	0.3835	0.1426

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

ISSR primerleri kullanılarak her bir primerin polimorfizm oranları Çizelge 4.12'da verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 63 bant elde edilmiştir. Değerlendirilen primerlerden polimorfizm oranında en az 3, en fazla 13 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 7 olarak tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda yetiştirilen bitkiler (Kontrol grubu), 4 farklı BBD'den birini içeren ortamlarda büyütülen klonlar ile karşılaştırıldığında, toplamda oluşan 63 banttan 31'ının polimorfik olduğu (%49.2) belirlenmiştir. En fazla polimorfizm oranı, **ISSR-2** primeri ile (% 75) amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm (%0) **ISSR-10** primeri ile elde edilmiştir. Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında en çok polimorfik bant veren birey sayısı **ISSR-8** primerinde elde edilmiş olup (PIC: 0.2963), tüm primerlerin ortalama PIC değeri 0.1426 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Rapor edilen literatüre göre, Botstein ve ark. (1980), 0.250'nin üzerindeki PIC sonucunun, polimorfizmde eşik değeri olduğunu rapor etmiştir.

Çizelge 4.13. *P. vera* L. *X P. terebinthus* L. klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
IRA P-2	2	2	4	0.5	0.4444	0.2222	0.1605
IRAP-4	0	3	3	0	0.3333	0	0
IRAP-5	5	1	6	0.83	0.6667	0.5533	0.3621
AYF	2	2	4	0.5	0.4444	0.2222	0.09877
TMS	4	0	4	1	0.4444	0.4444	0.2716
Toplam	13	8	21				
Mean	2.6	1.6	4.2	0.566	0.4667	0.2884	0.1786

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

IRAP primerleri kullanılarak her bir belirtecin polimorfizm oranları Çizelge 4.13'te verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 21 bant elde edilmiştir. Değerlendirilen markırlardan en az 3, en fazla 6 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 4.2 olarak tespit edilmiştir. 5 primerden elde edilen bantların ortalama polimorfizm oranı ise % 61.90'dır. En fazla polimorfizm oranı, **IRAP-5** primeri ile (% 66.67) amplifikasyonunda ortaya çıkarken, en düşük polimorfizm **IRAP-4** primeri ile elde edilmiştir (% 0). Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği, **IRAP-5** primerleri ile elde edilmiş olup bu değerle 0.3621'dir. IRAP primerlerinin ortalama PIC değeri 0.1786 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.13). Elde edilen ortalama PIC değerinin, 0.25'ten düşük olması oluşan kontrol grubu ile klonlar arasındaki polimorfizmin düşük oranda olduğunu göstermektedir (Botstein ve ark. 1980).

Çizelge 4.14 ve 4.15'de ise klonlar arasındaki Jaccard benzerlik matrisleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.62	1							
BA2	0.67	0.88	1						
KIN1	0.79	0.68	0.71	1					
KIN2	0.88	0.67	0.7	0.86	1				
IBA1	0.78	0.77	0.82	0.79	0.81	1			
IBA2	0.78	0.77	0.82	0.79	0.81	0.93	1		
NAA1	0.71	0.7	0.64	0.76	0.78	0.71	0.69	1	
NAA2	0.79	0.71	0.74	0.92	0.86	0.79	0.79	0.83	1

P. vera L. *X P. terebinthus* L. hibritine ait ISSR markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.14) ve dendogram (Şekil 4.6) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.62 ile 0.88 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 88) KIN2 klonuyken, en uzak klon (%60) BA1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.93 (IBA1 ve IBA2), en düşük ise 0.64'tir (NAA1 ve BA2) (Çizelge 4.14).

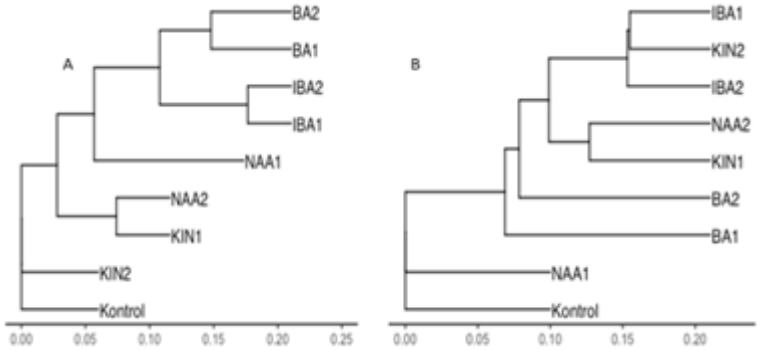
Çizelge 4.15. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.52	1							
BA2	0.61	0.65	1						
KIN1	0.72	0.75	0.78	1					
KIN2	0.68	0.8	0.74	0.84	1				
IBA1	0.67	0.7	0.72	0.83	0.89	1			
IBA2	0.67	0.7	0.72	0.74	0.89	0.88	1		
NAA1	0.8	0.55	0.65	0.76	0.72	0.81	0.81	1	
NAA2	0.76	0.7	0.72	0.83	0.79	0.78	0.68	0.71	1

P. vera L. *X P. terebinthus* L. hibritine ait IRAP markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.15) ve dendogram (Şekil 4.6) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.52 ile 0.8 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 80) ile NAA1 klonuyken, en uzak klonun

ise (% 52) BA1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.89 (KİN2 ve IBA1 ile IBA2 ve KİN2), en düşük ise 0.55'dir (NAA1 ve BA1) (Çizelge 4.15).

Şekil 4.6 klonlar arasındaki Jaccard uzaklıkları kullanılarak elde edilmiş dendrogramlar görülmektedir.



Şekil 4.6. A; ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram
B: IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram

Şekil 4.6 A'da Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın *P. vera* × *P. terebinthus* BBD'li (hormonlu ortam) hibritin KİN2 olurken en uzak genotip ise BA2 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin BA2 ve BA1 iken en uzak iki BBD'li hibrit KİN2 ve BA2 olmuştur. Şekil 4.6 B'de ise *P. vera* × *P. terebinthus* BBD'li (hormonlu ortam) hibritlerinin kontrolden en uzak BBD'li hibriti IBA1 ve KİN2 olduğu görülürken, en yakın NAA1 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin IBA1 ve KİN2 iken en uzak iki BBD'li hibrit NAA1 ve IBA1 olmuştur.

Çizelge 4.16 da belirteç sistemleri arasındaki korelasyon değeri gösterilmektedir.

Çizelge 4.16. Mantel korelasyon testi (p<=0.05)

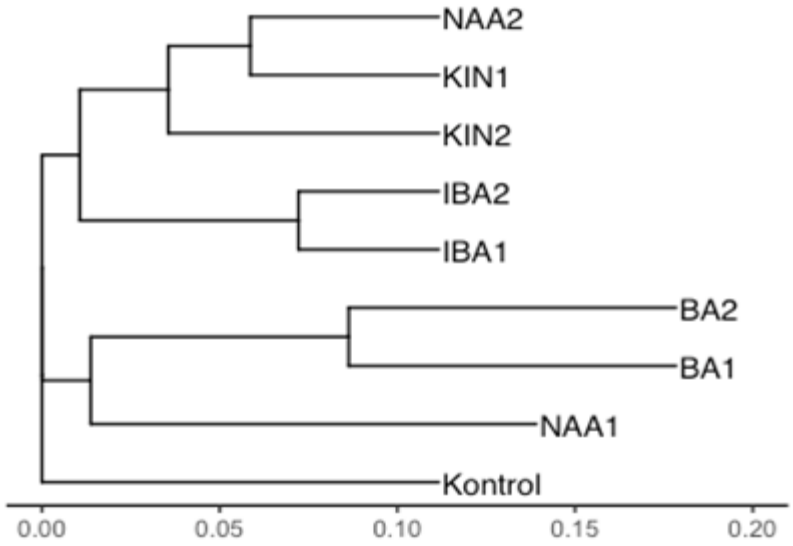
Korelasyon	P	Sig	Permutasyon
0.4043	0.02498	TRUE	1000

Çizelge 4.17'de birleştirilmiş belirteç sistemi ile elde edilen Jaccard benzerlik matrisi, Şekil 4.7'de ise Jaccard farklılık indisi ile elde edilmiş dendrogram görülmektedir.

Çizelge 4.17. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.59	1							
BA2	0.66	0.82	1						
KIN1	0.77	0.7	0.73	1					
KIN2	0.83	0.71	0.71	0.86	1				
IBA1	0.75	0.75	0.8	0.8	0.83	1			
IBA2	0.75	0.75	0.8	0.78	0.83	0.92	1		
NAA1	0.73	0.66	0.64	0.76	0.76	0.74	0.72	1	
NAA2	0.78	0.71	0.74	0.89	0.84	0.79	0.77	0.8	1

P. vera L. × *P. terebinthus* L. hibritine ait ISSR ve IRAP markırları kullanılarak birleştirilmiş belirteç Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.17) ve dendogram (Şekil 4.7) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.59 ile 0.83 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 83) KİN2 klonuyken, en uzak klon (% 59) BA1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.92 (IBA1 ve IBA2), en düşük ise 0.64'dür (NAA1 ve BA2) (Çizelge 4.17).



Şekil 4.7. Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram

Şekil 4.7'de Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***P. vera* L. × *P. terebinthus* L**. BBD'li (hormonlu ortam) hibriti NAA1 olurken en uzak genotip ise NAA2 hibriti olmuştur. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibrit KİN1 ve NAA2 iken en uzak iki BBD'li hibrit NAA1 ve NAA2 olmuştur.

4.8. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü) hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Çizelge 4.18 ve 4.19'de *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü) klonları için ISSR ve IRAP belirteçlerinin ayrımlama kapasiteleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. *Pistacia vera X Pistacia vera* (kontrollü tozlaşma) klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

Markır Tipi	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
ISSR-1	7	3	10	0.7	1.111	0.7778	0.1975
ISSR-2	2	4	6	0.33	0.6667	0.22	0.09053
ISSR4	6	2	8	0.75	0.8889	0.6667	0.2222
ISSR-5	1	3	4	0.25	0.4444	0.1111	0.1111
ISSR-6	3	7	10	0.3	1.111	0.3333	0.1086
ISSR-7	3	2	5	0.6	0.5556	0.3333	0.1778
ISSR-8	3	6	9	0.33	1	0.33	0.1097
ISSR-9	8	1	9	0.89	1	0.89	0.225
ISSR-10	0	3	3	0	0.3333	0	0
Toplam	33	31	64				
Mean	3.667	3.444	7.111	0.4611	0.7901	0.4069	0.1381

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

ISSR primerleri kullanılarak her bir primerin polimorfizm oranları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 64 bant elde edilmiştir. Değerlendirilen primerlerden polimorfizm oranında en az 3, en fazla 10 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 7.1 olarak tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda yetiştirilen bitkiler (Kontrol grubu), 4 farklı BBD'den birini içeren ortamlarda büyütülen klonlar ile karşılaştırıldığında, toplamda oluşan 64 banttan 33'ünün polimorfik olduğu (% 51.56) belirlenmiştir. En fazla polimorfizm oranı, **ISSR-9** primeri ile (% 89) amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük

polimorfizm (%0) **ISSR-10** primeri ile elde edilmiştir. Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında en çok polimorfik bant veren birey sayısı **ISSR-9** primerinde elde edilmiş olup (PIC: 0.225), tüm primerlerin ortalama PIC değeri 0.1381 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Rapor edilen literatüre göre, Botstein ve ark. (1980), 0.250'nin altındaki PIC sonucunun, düşük polimorfizm olduğunu rapor etmiştir.

Çizelge 4.19. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü) klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

Markır Tipi	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
IRAP-2	6	2	8	0.75	0.8889	0.6667	0.3272
IRAP-4	5	2	7	0.71	0.7778	0.5522	0.3104
IRAP-5	2	2	4	0.5	0.4444	0.2222	0.2469
AYF	8	2	10	0.8	1.111	0.8889	0.1975
TMS	3	2	5	0.6	0.5556	0.3333	0.2272
Toplam	24	10	34				
Ortalama	4.8	2	6.8	0.672	0.7556	0.5327	0.2618

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

IRAP primerleri kullanılarak her bir belirtecin polimorfizm oranları Çizelge 4.19'te verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 34 bant elde edimiştir. Değerlendirilen markırlardan en az 4, en fazla 10 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 6.8 olarak tespit edilmiştir. 5 primerden elde edilen bantların ortalama polimorfizm oranı ise % 70.58'dir. En fazla polimorfizm oranı, **AYF** primeri ile (% 80) amplifikasyonunda ortaya çıkarken, en düşük polimorfizm **IRAP-5** primeri ile elde edilmiştir (% 50). Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği, **IRAP-2 ve IRAP-4** primerleri ile elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla, 0.3272 ve 0.3104'tür. IRAP primerlerinin ortalama PIC değeri 0.2618 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.19). Elde edilen ortalama PIC değerinin, 0.25 ile 0.5 arasında olması makul polimorfizmin olduğunu göstermektedir (Botstein ve ark., 1980)

Çizelge 4.20 ve 4.21'de ise klonlar arasındaki Jaccard benzerlik matrisleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	**BA1**	**BA2**	**KIN1**	**KIN2**	**IBA1**	**IBA2**	**NAA1**	**NAA2**
Kontrol	1								
BA1	0.8	1							
BA2	0.85	0.82	1						
KIN1	0.89	0.79	0.9	1					
KIN2	0.87	0.77	0.89	0.98	1				
IBA1	0.84	0.77	0.86	0.92	0.9	1			
IBA2	0.57	0.64	0.56	0.62	0.63	0.66	1		
NAA1	0.89	0.82	0.9	0.97	0.95	0.95	0.62	1	
NAA2	0.85	0.81	0.87	0.9	0.88	0.92	0.66	0.93	1

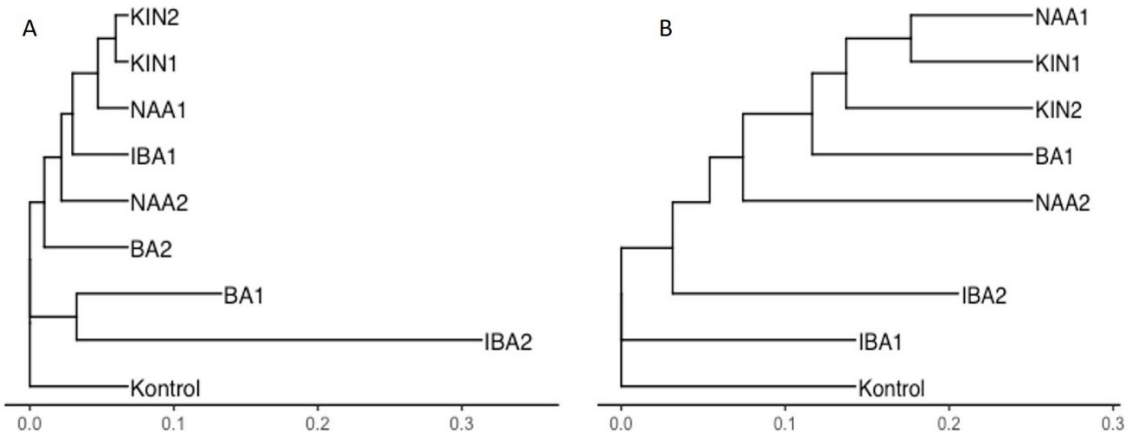
Pistacia vera L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü) hibritine ait ISSR markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.20) ve dendogram (Şekil 4.8) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.57 ile 0.89 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 89) KIN1 ve NAA1 klonlarıyken, en uzak klon (% 57) IBA2 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.98 (KİN1 ve KİN2), en düşük ise 0.64'tir (IBA2 ve BA2) (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.21. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.65	1							
BA2	0.44	0.54	1						
KIN1	0.57	0.71	0.44	1					
KIN2	0.62	0.72	0.47	0.81	1				
IBA1	0.71	0.67	0.52	0.64	0.71	1			
IBA2	0.68	0.57	0.42	0.56	0.54	0.62	1		
NAA1	0.6	0.76	0.45	0.85	0.73	0.56	0.58	1	
NAA2	0.54	0.64	0.56	0.68	0.62	0.7	0.59	0.65	1

Şekil 4.8'de klonlar arasındaki Jaccard uzaklıkları kullanılarak elde edilmiş dendrogramlar görülmektedir.

Pistacia vera L. *X Pistacia vera* L. (kontrollü). hibritine ait IRAP markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.21) ve dendogram (Şekil 4.8) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.44 ile 0.71 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 71) ile IBA1 klonuyken, en uzak klonun ise (% 44) BA2 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.85 (KİN1 ve NAA1), en düşük ise 0.42'dir (IBA2 ve BA2)(Çizelge 4.21).



Şekil 4.8. A;ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram. B;IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram

Şekil 4.8 A'da Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***Pistacia vera X Pistacia vera*** **(kontrollü tozlaşma)** BBD'li (hormonlu ortam) hibritin IBA2 ve BA1 olurken en uzak genotip ise KİN2 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin KİN1 ve KİN2 iken en uzak iki BBD'li hibrit IBA2 ve KİN2 olmuştur. Şekil 4.8 B'de ise Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***Pistacia vera X Pistacia vera*** **(kontrollü tozlaşma)** BBD'li (hormonlu ortam) hibritin IBA1 olurken en uzak genotip ise NAA1 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin NAA1 ve KİN1 iken en uzak iki BBD'li hibrit IBA1 ve NAA1 olmuştur.

Çizelge 4.22'de belirteç sistemleri arasındak korelasyon değeri gösterilmektedir.

Çizelge 4.22. Mantel korelasyon testi (p<=0.05)

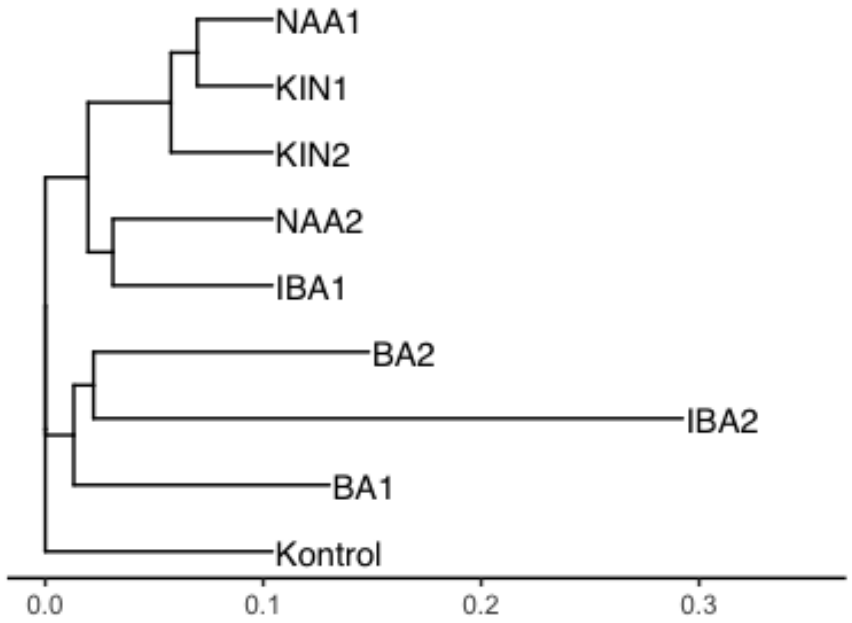
Korelasyon	P	Sig	Permutasyon
0.2641	0.1708	FALSE	1000

Çizelge 4.23'de birleştirilmiş belirteç sistemi ile elde edilen Jaccard benzerlik matrisi, Şekil 4.9'da ise Jaccard farklılık indisi ile elde edilmiş dendrogram görülmektedir.

Çizelge 4.23. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi

BBD Tipi	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.76	1							
BA2	0.73	0.73	1						
KIN1	0.79	0.77	0.74	1					
KIN2	0.8	0.76	0.75	0.93	1				
IBA1	0.81	0.74	0.76	0.83	0.85	1			
IBA2	0.59	0.62	0.52	0.6	0.6	0.65	1		
NAA1	0.8	0.8	0.75	0.93	0.88	0.83	0.61	1	
NAA2	0.76	0.76	0.77	0.83	0.8	0.85	0.64	0.85	1

Pistacia vera X Pistacia vera (kontrollü tozlaşma) hibritine ait ISSR ve IRAP markırları kullanılarak birleştirilmiş belirteç Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.23) ve dendogram (Şekil 4.9) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.59 ile 0.81 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 81) IBA1 klonuyken, en uzak klon (% 59) IBA2 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.93 (KİN1 ve KİN2, KİN1 ve NAA1,), en düşük ise 0.52'dir (BA2 ve IBA2) (Çizelge 4.23).



Şekil 4.9. Birleştirilmiş belirteç sisteminde elde edilen dendrogram

Şekil 4.9'da Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın *Pistacia vera X Pistacia vera* (kontrollü tozlaşma) BBD'li (hormonlu ortam) hibriti BA1 olurken en uzak genotip ise NAA1 hibriti olmuştur. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibrit KİN1 ve NAA1 iken en uzak iki BBD'li hibrit NAA1 ve BA1 olmuştur.

4.9 *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (serbest) hibritinin ISSR ve IRAP Primerleri ile Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Çizelge 4.24 ve 4.25'de *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (serbest) klonları için ISSR ve IRAP belirteçlerinin ayrımlama kapasiteleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (serbest) klonlarında ISSR belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

Markır Tipi	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
ISSR-1	7	4	11	0.64	1.222	0.7822	0.2694
ISSR-2	6	4	10	0.6	1.111	0.6667	0.1827
ISSR4	6	4	10	0.6	1.111	0.6667	0.1975
ISSR-5	1	3	4	0.25	0.4444	0.1111	0.1235
ISSR-6	6	7	13	0.46	1.444	0.6644	0.1937
ISSR-7	5	3	8	0.62	0.8889	0.5511	0.142
ISSR-8	6	8	14	0.43	1.556	0.6689	0.1376
ISSR-9	7	5	12	0.58	1.333	0.7733	0.2099
ISSR-10	3	0	3	1	0.3333	0.3333	0.2469
Toplam	49	38	87				
Mean	5.222	4.222	9.444	0.5756	1.049	0.5798	0.1892

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

ISSR primerleri kullanılarak her bir primerin polimorfizm oranları Çizelge 4.24'de verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 87 bant elde edilmiştir. Değerlendirilen primerlerden polimorfizm oranında en az 3, en fazla 14 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 9.4 olarak tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda yetiştirilen bitkiler (Kontrol grubu), 4 farklı BBD'den birini içeren ortamlarda büyütülen klonlar ile karşılaştırıldığında, toplamda oluşan 87 banttan 49'unun polimorfik olduğu (% 56.32) belirlenmiştir. En fazla polimorfizm oranı, **ISSR-10** primeri ile (% 100) amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm (% 25) **ISSR-5** primeri ile elde edilmiştir. Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında en çok polimorfik bant veren birey sayısı **ISSR-1** primerinde elde edilmiş olup (PIC: 0.2694), tüm primerlerin ortalama PIC değeri 0.1892 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.24). Rapor edilen literatüre göre, Botstein ve ark. (1980), 0.250'nin altındaki PIC sonucunun, düşük polimorfizm olduğunu rapor etmiştir.

Çizelge 4.25. *Pistacia vera* L. *X Pistacia vera* L. (serbest tozlaşma) klonlarında IRAP belirteç sistemindeki ayrımlama kapasitesi

Markır Tipi	nP	nM	nL	pP	nLA	EMR	PIC
IRAP-2	6	1	7	0.86	0.7778	0.6689	0.3175
IRAP-4	8	2	10	0.8	1.111	0.8889	0.2765
IRAP-5	4	0	4	1	0.4444	0.4444	0.2716
AYF	7	2	9	0.78	1	0.78	0.1866
TMS	2	2	4	0.5	0.4444	0.2222	0.1605
Toplam	27	7	34				
Mean	5.4	1.4	6.8	0.788	0.7556	0.6009	0.2425

nP; Polimorfik lokus, nM; Monomorfik lokus, nL; Toplam lokus, pP; Polimorfik lokus orani, nU; Deney basina dusen lokus, EMR; Effective multiplex ratio, PIC; Polymorphism information content

IRAP primerleri kullanılarak her bir belirtecin polimorfizm oranları Çizelge 4.25'te verilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, toplam 34 bant elde edimiştir. Değerlendirilen markırlardan en az 4, en fazla 10 olmak üzere primer başına düşen bant sayısı 6.8 olarak tespit edilmiştir. 5 primerden elde edilen bantların ortalama polimorfizm oranı ise % 79.41'dir. En fazla polimorfizm oranı, **IRAP-2** primeri ile (% 85.71) amplifikasyonunda ortaya çıkarken, en düşük polimorfizm **TMS** primeri ile elde edilmiştir (% 50). Primerlerin PIC değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği, **IRAP-2 ve IRAP-4** primerleri ile elde edilmiş olup bu değerler sırasıyla, 0.3175 ve 0.2765'dir. IRAP primerlerinin ortalama PIC değeri 0.2425 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.25). Elde edilen ortalama PIC değerinin, 0.25'ten düşük olması oluşan klonlar ile kontrol grubu arasında düşük polimorfizmin olduğunu göstermektedir (Botstein ve ark. 1980).

Çizelge 4.26 ve 4.27'de ise klonlar arasındaki Jaccard benzerlik matrisleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.26: ISSR belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.82	1							
BA2	0.75	0.88	1						
KIN1	0.73	0.77	0.78	1					
KIN2	0.79	0.71	0.67	0.67	1				
IBA1	0.65	0.57	0.52	0.53	0.78	1			
IBA2	0.86	0.82	0.78	0.73	0.81	0.67	1		
NAA1	0.81	0.76	0.72	0.67	0.87	0.72	0.89	1	
NAA2	0.85	0.81	0.77	0.72	0.8	0.66	0.93	0.93	1

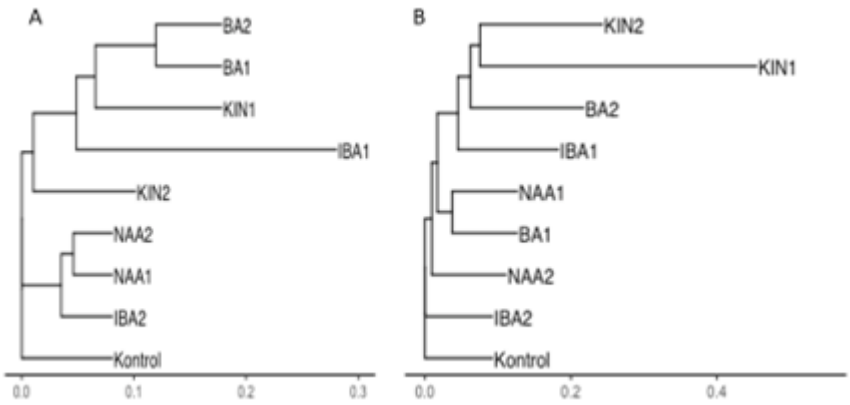
Pistacia vera L. *X Pistacia vera* L. (serbest tozlaşma) hibritine ait ISSR markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.26) ve dendogram (Şekil 4.10) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.65 ile 0.86 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 86) IBA2 klonuyken, en uzak klon (% 65) IBA1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde en yüksek benzerlik oranı 0.93 (IBA2 ve NAA2 ile NAA1 ve NAA2) iken, en düşük ise 0.64'tir (IBA1 ve BA2)(Çizelge 4.26).

Çizelge 4.27. IRAP belirteçleri için Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	BA1	BA2	KIN1	KIN2	IBA1	IBA2	NAA1	NAA2
Kontrol	1								
BA1	0.79	1							
BA2	0.67	0.74	1						
KIN1	0.44	0.46	0.44	1					
KIN2	0.67	0.74	0.62	0.5	1				
IBA1	0.74	0.7	0.59	0.36	0.55	1			
IBA2	0.81	0.76	0.7	0.43	0.64	0.77	1		
NAA1	0.81	0.82	0.7	0.54	0.77	0.67	0.79	1	
NAA2	0.78	0.72	0.73	0.44	0.67	0.74	0.81	0.81	1

Şekil 4.10.A ve 4.10.B'de klonlar arasındaki Jaccard uzaklıkları kullanılarak elde edilmiş dendrogramlar görülmektedir.

Pistacia vera L. *X Pistacia vera* L. (serbest tozlaşma) hibritine ait IRAP markırları kullanılarak Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.27) ve dendogram (Şekil 4.10) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.44 ile 0.81 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 81) ile IBA2 ve NAA1 klonlarıyken, en uzak klonun ise (% 44) KİN1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.82 (BA1 ve NAA1), en düşük ise 0.36'dir (KİN1 ve IBA1) (Çizelge 4.27).



Şekil 4.10. A; ISSR belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram. B;IRAP belirteç sistemi ile elde edilmiş dendrogram

Şekil 4.10 A'da Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***Pistacia vera X Pistacia vera*** **(serbest tozlaşma)**. BBD'li (hormonlu ortam) hibritin IBA2 olurken en uzak genotip ise BA2 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin BA1 ve BA2 en uzak iki BBD'li hibrit IBA2 ve BA2 olmuştur. Şekil 4.10 B'de ise Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***Pistacia vera X Pistacia vera*** **(serbest tozlaşma)** BBD'li (hormonlu ortam) hibritin IBA2 olurken en uzak genotip ise KİN2 bireyi olmuştur. Ayrıca herbir genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibritin KİN1 ve KİN2 iken en uzak iki BBD'li hibrit IBA2 ve KİN2 olmuştur.

Çizelge 4.28'de belirteç sistemleri arasındak korelasyon değeri gösterilmektedir.

Çizelge 4.28. Mantel korelasyon testi (p<=0.05)

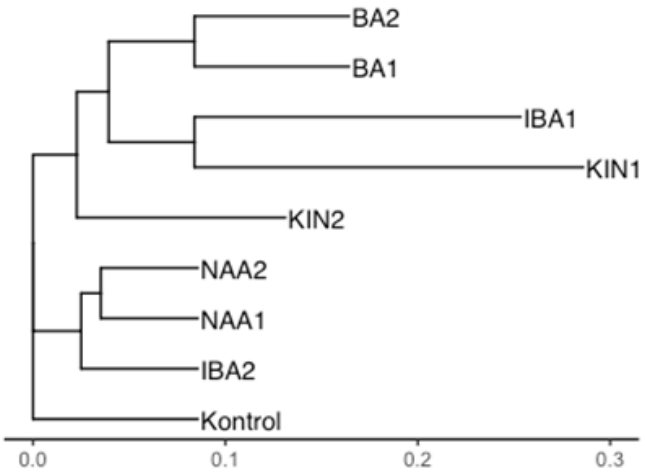
Korelasyon	P	Sig	Permutasyon
0.493	0.08292	FALSE	1000

Çizelge 4.29'da birleştirilmiş belirteç sistemi ile elde edilen Jaccard benzerlik matrisi, Şekil 4.11'de ise Jaccard farklılık indisi ile elde edilmiş dendrogram görülmektedir.

Çizelge 4.29. Birleştirilmiş belirteç sistemi kullanılarak elde edilen Jaccard benzerlik matrisi

	Kontrol	**BA1**	**BA2**	**KIN1**	**KIN2**	**IBA1**	**IBA2**	**NAA1**	**NAA2**
Kontrol	1								
BA1	0.81	1							
BA2	0.73	0.84	1						
KIN1	0.65	0.67	0.68	1					
KIN2	0.75	0.72	0.65	0.62	1				
IBA1	0.67	0.61	0.54	0.48	0.71	1			
IBA2	0.85	0.8	0.76	0.64	0.77	0.7	1		
NAA1	0.81	0.77	0.71	0.64	0.84	0.71	0.86	1	
NAA2	0.83	0.79	0.76	0.64	0.77	0.68	0.9	0.9	1

Pistacia vera X Pistacia vera (serbest tozlaşma). hibritine ait ISSR ve IRAP markırları kullanılarak birleştirilmiş belirteç Jaccard benzerlik matrisi (Çizelge 4.29) ve dendogram (Şekil 4.11) incelendiğinde, kontrol grubu ile klonlar arasındaki benzerlik oranı 0.65 ile 0.85 arasında değişmektedir. Bu durumda, kontrol grubuna en yakın benzerlik oranı (% 85) IBA2 klonuyken, en uzak klon (% 65) KİN1 olmuştur. Elde edilen tüm benzerlik matriksi klonlar açısından incelendiğinde ise en yüksek benzerlik oranı 0.90 (IBA2 ve NAA2 ile NAA1 ve NAA2), en düşük ise 0.48'dir (KİN1 ve IBA1) (Çizelge 4.29).



Şekil 4.11. Birleştirilmiş belirteç sistemiyle elde edilen dendrogram

Şekil 4.11'de Kontrol grubuna (hormonsuz ortam) en yakın ***Pistacia vera X Pistacia vera*** **(serbest tozlaşma)** BBD'li (hormonlu ortam) hibriti IBA2 olurken en

uzak genotip ise BA2 hibriti olmuştur. Ayrıca herbir BBD'li genotipin birbirlerine olan yakınlıkları değerlendirildiğinde en yakın iki BBD'li hibrit BA1 ve BA2 ile NAA1 ve NAA2 iken en uzak iki BBD'li hibrit IBA2 ve BA2 olmuştur.

4.10. Köklenen Sürgünlerin Dış Ortama Adaptasyonu Çalışmaları

İn vitro ortamda gelişen bitkiler kültür kaplarında çıkarılıp çeşme suyunda iyice agar jelden temizlendikten sonra dah önce steril edilen torf toprak kağıt bardaklara bırakıldı ve ağızları naylon poşetlerle kapatıldı (Şekil 4.12). 16 saat ışık 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyoda tabi tutuldu.3-4 gün sonra kademeli bir şekilde naylon poşetlerde delikler açıldı.10 gün sonra tamamen poşetlerden çıkarıldı ve saksılara ekildi ve büyüme odasında gelişimleri sağlandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Kültürden alınan bitkilerin torfa aktarılması



Şekil 4.13.Bitkilerin saksılara aktarılması

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, dört farklı antepfıstığı melez gentipinin tohumlarından in vitro'da farklı BBD'lerde çimlendirilerek hormonsuz ortamdaki bitki ile hormonlu ortamdaki bitkiler arasında olası somaklonal varyasyonların tespiti için 2 farklı moleküler belirteç (ISSR ve IRAP) kullanılarak melezlerde farklı oranlarda polimorfizm tespit edilmiştir. Bu durum elde edilen polimorfizm oranlarının daha güvenilir olmasını mümkün kılar. Kullanılan bu primerlerin farklı çalışma sistemi ve ayrımlama kapasitesi vardır. Araştırmada kullanılan ISSR markörleri genomun tekrar dizilerinin bulunduğu bölgeler arasındaki dizilerdeki olası değişikliklerin saptanmasını sağlayan yüksek polimorfizm oranı bulabilir. Bir diğer markör ise Retrotranspozonlar (IRAP) transkripsiyon ve entegresyon sırasında rol oynayan bitki genomlarının çok yaygın bulunurlar. Bu durum, hareketli transpozon özelliği ve tüm genomu kapsaması gibi özelliklerinden dolayı somaklonal varyasyonda oldukça etkili DNA markörüdür. **(Voytas ve ark. 1992; Kumar ve Bennetzen 1999).**

Bununla birlikte, PIC değerleri incelendiğinde aslında kullanılan yöntemler arasında çok da yüksek oranda farklılığın olmadığı görülmektedir. Ayrıca, literatürde 0.250'nin altındaki PIC değerlerinin, polimorfizm konusunda çok az bilgi verdiği belirtilmektedir (Botstein ve ark. 1980, Akdemir ve ark., 2016; Kılınç 2014). Bu bağlamda elde edilen sonuçlar bütünüyle değerlendirildiğinde, antepfıstığı hormonsuz melezleri ile BBD'li ortamdaki melezleri arasında, düşük oranda somaklonal varyasyon olduğu söylenebilir ve izole embriyo melezlerden elde edilen hormonlu bitkiciklerde somaklonal varyasyonun oluştuğuna dair ilk rapordur.

Bu çalışma bitki doku kültüründe Pistachia cinsine ait adı geçen 4 melez türün embriyo kültüründe besi ortamı, MS'nin kuvvetleri, karbon kaynağı ve BBD'lerin etkisi ilk kez araştırıldığı için özgün bir çalışmadır. Bu nedenle gelecekte bununla ilgili araştırmalara ışık tutacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

Abousalim, A. and Mantell, S.H. 1992. Micrografting of pistachio (Pistacia vera L. cv. Mateur). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29: 231-234.

Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A., & Çiftçi, Y. O. (2016). Detection of variation in long-term micropropagated mature pistachio via DNA-based molecular markers. *Applied biochemistry and biotechnology*, *180*(7), 1301-1312.

Al-Saghir, M.G. 2009. Evolutionary history of the genus Pistacia (Anacardiaceae). İnternational journal of Botany, 5 (3): 255-257.

Atlı, H.S., Arpacı S., Akgün A., Kaşka N., Eskalen A., Can C., Özgüven A.I., Küsek M., Karadağ S., Sarpkaya K. (2004). "Pistacia khinjuk Stocks' un Pistacla Cinsinin Değişik Türleri Arasında Kontrollü Melezleme Yolu İle Sulu Koşullarda Antepfıstıkları için Anaç İslahı", (TÜBİTAK Projesi).

Ayfer, M. (1959). Antepfıstığının döllenme biyolojisi üzerinde araştırmalar. ***Ankara Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları***, (148).

Benmahioul, B., Kaid-Harche, M., Dorion, N., Daguin, F., 2009. In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (Pistacia vera L.). Scientia Horticulturae, 122: 479–483.

Bilgen, Gezerel, Ö., ve Kaşka, N. (1985). Effects of systemic leaf fertilisers on the yield and quality of Pistachio nuts, in: N. Kaşka, A.B. Küden, L. Ferguson and T. Michailides (Editors). First International symposium on pistachio Nut. Acta Horticulturae,419:135p.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32(3), 314.

Campbell, B. C., LeMare, S., Piperidis, G., ve Godwin, I. D., IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley, ***Molecular Breeding*** **27** (2010) 193-206.

Çalar (2014). Melez Pistacia l. genotiplerinin klonal mikroçoğaltımı ve ırap-ıssr moleküler belirteçleri ile genetik kararlılıklarının belirlenmesi (yüksek lisans tezi).

Devran, z. (2016). Moleküler işaretleyicilerin dayanıklılık ıslahında kullanılması. *derim*, *20*(1), 1-6.

Dietrich, K. 1924. Über Kultur von Embryonen ausserhalb des Samens. ***Flora (Jena)*** 117:379–417.

Grout, B.W.W. 1986. Embryo culture and cryopreservation for the conservation of genetic resources of species with recalcitrant seed, p. 303–309. In: L.A. Withers and P.G. Alderson (eds.). Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworths, London.

Hu, C. and P. Wang. 1986. Embryo culture: Technique and applications, p. 43– 96. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, and P.V. Ammirato (eds.). Handbook of plant cell culture. vol. 4. Macmillan, New York.

Hu, C. and P. Wang. 1986. Embryo culture: Technique and applications, p. 43– 96. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, and P.V. Ammirato (eds.). Handbook of plant cell culture. vol. 4. Macmillan, New York.

Jaccard, P., Nouvelles Recherches Sur La Distribution Florale, ***Bulletin de la Société vaudoise des Sciences Naturelles*** **44** (1908) 223-270.

Kafkas, S., Kaska N. (1998). “Pistachio rootstock breeding by crossing different wild species grown in Turkey”, Proceedings of the Second International Symposium on Pistachios and Almonds, Davis-California, 24-29 August 1997, Acta Hortic. ***ISHS, Belgium,*** 470: 219-225.

Kılınç, F. M., Süzerer, V., Çiftçi, Y. Ö., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, A. A., ... & Metin, Ö. K. (2014). Clonal micropropagation of *Pistacia* lentiscus L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. ***Plant growth regulation,*** 75(1), 75-88.

Kumar, A., Bennetzen, J. L. 1999. Plant retrotransposons. Annual review of genetics, 33(1): 479532.

Laibach, F. 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. Z. Bot. 17:417–459.

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Wedden, N.F. and Reısch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Mol. Biol. Reptr., 12: 6-13.

Norstog, K. 1979. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology, p. 179–202. In: W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock, and V. Raghavan (eds.). Plant cell and tissue culture. Ohio State Univ. Press, Columbus

Özçağıran, R. (1974). Meyve ağaçlarında anaç ile kalem arasındaki fizyolojik ilişkiler. ***Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,*** *243*.

Ramming, D.W. 1985. In ovulo embryo culture of early-maturing Prunus. HortScience 20:419–420.

Ramming, D.W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25:393–398.

Rangan, T.S. 1984. Culture of ovules, p. 227–231. In: I.K. Vasil (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. vol. 1. Laboratory procedures and their applications. Academic, New York.

Rechinger K.W. (1969). Flora des Iranshen Hochlandes und umrahmen den Cebirces, Akad. Druck-U-Verlag., Graz, Austria.

Sabeti H., Forests, Trees and shrubs of Iran, Yazd Univ. Pubi., 2nd ed,, 1994, 875 p.

Sahnı, S., Pathak, J. & Kundu, M. 2017. Embryo Culture and Endosperm Culture. In: Plant Biotechnology, Volume 1 (pp. 149-166). Apple Academic Press.

Sharma, H.C. and B.S. Gill. 1983. New hybrids between Agropyron and wheat. 2. Production, morphology and cytogenetic analysis of F1 hybrids and backcross derivatives. Theor. Appl. Genet. 66:111–121.

Tabatabaee M, (1965). Pistachio and its importance in Iran, For. Serv. Press, Minist. Agric.,Tehran, Iran, 160 p.

Tukey, H.B. 1944. Excised-embryo method of testing the germinability of fruit seed with particular reference to peach seed. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 45:211–219

Uygur, N. (1986). Antepfıstıklarına Anaç Seçimi II, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Sonuç Raporu, 35 s.

Van Overbeek, J., M.E. Conklin, and A.F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos. Science 94:350–351.

Voytas, D. F., Cummings, M. P., Koniczny, A., Ausubel, F. M., Rodermel, S. R. 1992. Copialike retrotransposons are ubiquitous among plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(15): 7124-7128.

Williams, E. 1980. Hybrids between Trifolium ambiguum and T. hybridum obtained with the aid of embryo culture. ***N.Z. J. Bot.*** 18:215–220.

Williams, E. and G. De Lautour. 1980. The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. ***Bot. Gaz.*** (Chicago) 141:252–257.

Williams, E.G., I.M. Verry, and W.M. Williams. 1982. Use of embryo culture in interspecific hybridization, p. 119–128. In: I.K. Vasil, W.R. Scowcroft, and K.J. Frey (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic, New York.

Yeung, E.C., T.A. Thorpe, and C.J. Jensen. 1981. In vitro fertilization and embryo culture, p. 253–271. In: T.A. Thorpe (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic, New York.

Zohary M. A monographic study of the genus Pistacia in Pa lestine, ***J. Bot. Jerus. Ser***. 5 (1952). 187-228

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Mehmet Ali YAVUZ

Doğum Yeri **:** Diyarbakır

Doğum Tarihi **:** 10.07.1987

Medeni Hali **:** Bekar

Yabancı Dili **:** İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lise **:** Ergani Lisesi /2000-2003

Lisans **:**Dicle Üniversitesi /206-2012

YüksekLisans **:**Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/2019

Proje ve Sertifika

Pedagojik Formasyon Eğitim Sertifikası / D.Ü. Ziya Gökalp Eğitim Fak.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	MEHMET ALİ YAVUZ
ÖĞRENCİ NO	15801003
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	BİYOLOJİ
PROGRAM	YÜKSEK LİSANS
TEZ KONUSU	**ANTEPFISTIĞI MELEZ GENOTİPLERİNİN EMBRİYO KÜLTÜRÜ İLE ÇİMLENDİRİLMESİ VE GELİŞEN BİTKİLERİN GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ**
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	TEZ SAVUNMA SINAVI SONRASI
SAYFA SAYISI	76
BENZERLİK ORANI	% 13
RAPORLAMA TARİHİ	31/07/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 76 sayfalık kısmına ilişkin, 31/07/2019 tarihinde şahsım tarafından 'Turnitin'.adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 13'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

31/07/2019
Mehmet Ali YAVUZ
Öğrencinin Adı Soyadı

31/07/2019 Ahmet ONAY **Tez Danışmanı**	31/07/2019 Yüksel COŞKUN **Anabilim Dalı Başkanı** Doç. Dr. M. Zahir Düz U.

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00