

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İsmail VAROL

BAZI TURUNÇGİL TÜRLEİNDE EMBRİYOGENİK KALLUSLARIN *IN VITRO* MUHAFAZASI VE GENETİK KARARLILIKLARININ RAPD MARKIRLARI İLE ARAŞTIRILMASI

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI TURUNÇGİL TÜRLERİNDE EMBRİYOGENİK
KALLUSLARIN *IN VITRO* MUHAFAZASI ve
GENETİK KARARLILIKLARININ
RAPD MARKIRLARI ile ARAŞTIRILMASI**

İsmail VAROL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 15/ 01/ 2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından **Oybirliği /**
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....

Doç. Dr.
Yıldız AKA-KAÇAR
DANIŞMAN

İmza.....

Prof. Dr.
Turgut YEŞİLOĞLU
ÜYE

İmza.....

Prof. Dr.
Selim ÇETİNER
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç. Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2006YL31

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

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TURUNÇGİL TÜRLERİNDE EMBRİYOGENİK KALLUSLARIN *IN VITRO* MUHAFAZASI VE GENETİK KARARLILIKLARININ RAPD MARKIRLARI İLE ARAŞTIRILMASI

İsmail VAROL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR

Yıl : 2006, Sayfa : 80

Jüri : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR

: Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU

: Prof. Dr. Selim ÇETİNER

Bu araştırmada on farklı turuncgil genotipinden elde edilen embriyonik kallusların *in vitro*'da azaltılmış büyüme koşullarında muhafazası ve farklı muhafaza sürelerinde (30, 60, 90 gün) bu kalluslardan sürgün ve bitkicik elde etme olanakları araştırılmıştır. *In vitro* muhafaza sonrasında elde edilen sürgün ve bitkiciklerde moleküler analizler gerçekleştirilerek *in vitro* koşullarda muhafaza sırasında genetik yapılarında bir değişim olup olmadığı belirlenmiştir.

Embriyogenik kalluslar tam çiçeklenmeden 2-8 hafta sonra kültüre alınan ovüllerden elde edilmişlerdir. Tez çalışması kapsamında kullanılan turuncgil türlerine ait kallus oluşum oranları değerlendirildiğinde; I. yıl denemelerinde, en fazla kallus oluşum oranı *C. aurantium* (% 52) ve *P. trifoliata* (% 40) türlerinde gerçekleşmiştir. En düşük kallus oluşturma oranı % 9 ile *C. medica*'da gerçekleşirken, *C. ichangensis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir. II. yıl denemelerinde I. yıl denemelerinde olduğu gibi en yüksek kallus oluşturma oranı *C. aurantium* (% 52) türünden elde edilmiş, bunu % 40 kallus oluşturma oranı ile *P. trifoliata* (% 40) izlemiştir. En düşük kallus oluşturma oranı % 5 ile *C. medica*'da gerçekleşmiştir. *C. grandis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Denemede yer alan genotiplerden elde edilen kallusların ağırlıkları değerlendirildiğinde birinci yıl denemelerinde en fazla kallus ağırlık ortalamaları *C. aurantium* (0,90 g) ve *P. trifoliata* (0,85 g) türlerinde görülmüştür. Bu türlerin dışındaki diğer türler arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. II. Yıl denemelerinde kallus ağırlıkları incelendiğinde *C. aurantium* (0,55 g), *P. trifoliata* (0,25 g) ve *C. ichangensis* (0,24 g) türlerinden en yüksek kallus ağırlıkları elde edilmiştir.

Sürgün ve bitkiciğe dönüşüm oranları bakımından I. yıl denemelerinde *E. glauca* ve *P. trifoliata*'dan sırasıyla 30, 60, 90 günlük kalluslardan %60 (3/5), %90,5 (19/21), %100 (10/10) *E. glauca*'dan %75 (6/8), %100 (6/6), %91,7 (11/12) *P. trifoliata*'dan sürgün ve bitkicik elde edilirken, diğer genotiplerden sürgün ve bitkicik elde edilememiştir. II. yıl denemelerinde *E. glauca*'dan sırasıyla 30, 60, 90 günlük kalluslardan 25, 27, 9 sürgün, *P. trifoliata*'dan 3, 3, 0 sürgün, *C. reticulata*'dan 3, 1, 0 sürgün, *C. ichangensis*'ten 1, 0, 2 sürgün elde edilmiştir.

Çalışma sonunda yapılan RAPD yöntemi ile elde edilen bitkicik ve sürgünlerin genetik stabiliteeleri saptanmış, ismine doğru oldukları ortaya konulmuştur. Toplam 21 RAPD primeri kullanılmış ve 8 primer istenilen amplifikasyonu vermediği için değerlendirilmeye alınmamıştır. Değerlendirilmeye alınan 13 primerden toplam 33 band elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Citrus, Embriyogenik kallus, BAP, *In vitro* muhafaza, genetik kararlılık

ABSTRACT
Msc THESIS

***IN VITRO* CONSERVATION of EMBRYOGENIC CALLUS OBTAINED from
SOME CITRUS SPECIES and DETERMINATION of THEIR GENETIC
STABILITY by USING RAPD MARKER**

İsmail VAROL

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR

Year : 2006, Pages: 80

Jury : Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR

: Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU

: Prof. Dr. Selim ÇETİNER

In this research, *in vitro* conservation in slow growth conditons of ovule-derived embryogenic callus from ten different citrus species and possibilities of developing in to shoots and plantlets from these calli at different conservation periods (30, 60, 90 days) is studied. After *in vitro* conservation molecular analysis was performed on obtained shoot and plantlets, and determined genetic stability during *in vitro* conservation conditions.

Embryogenic calli were obtained from ovule cultured 2-8 weeks after anthesis. Callus formation ratio of citrus species used on the thesis were taken in to consideration; at the treatment of first year; *C. aurantium* (% 52) and *P. trifoliata* (% 40) had the highest callus formation rate. While *C. medica* (% 9) had the lowest callus formation rate, *C. ichangensis* had no callus formation. At the treatment of second year; as the first year treatment, *C. aurantium* (% 52) and *P. trifoliata* (% 40) had highest callus formation ratio, *C. medica* had the lowest callus formation rate (% 5), *C. grandis* had no callus formation.

Callus weight of citrus species used on the thesis was taken in to consideration, at the first year *C. aurantium* (0.90 g) and *P. trifoliata* (0.85 g) had the highest callus weight ratio. Other species had no difference from viewpoint of callus weight as statistically. At the second year; *C. aurantium* (0.55 g), *P. trifoliata* (0.25 g) and *C. ichangensis* (0.24 g) had the highest callus weight.

Viewpoint of development ratio in to shoot and plantlet, at the first year treatment; shoots and plantlets were obtained from 30, 60, 90 daily calli of *E. glauca* as % 60 (3/5), %90.5 (19/21), % 100 (10/10) respectively and *P. trifolita* as % 75 (6/8), % 100 (6/6), % 97.7 (11/12) respectively. At the second year treatment 25, 27, 9 shoots (*E. glauca*), 3, 3, 0 shoots (*P. trifoliata*), 3, 1, 0 shoots (*C. reticulata*) and 1, 0, 2 shoots (*C. ichangensis*) were obtained form 30, 60, 90 daily calli respectively.

At the end of thesis, genetically stability of shoots and plantlets obtain from callus was determined by RAPD makers and it was understood that recovery they was true to the type. Totally 21 RAPD primers were used, 8 primers couldn't conserdered to give unexpected amplification. Thirteen primers which is considered gave totally 33 bands.

Key Words: *Citrus*, Embryogenic callus, BAP, *in vitro* conservation, genetic stability

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve çalışmam boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi sırasında beni sabırla dinleyen, dostça eleştiren ve sevgi ile teşvik eden danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Yıldız AKA-KAÇAR**'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmanın başlangıç aşamasında materyallerimin belirlenmesinde yardımcı olan ve kendilerinden edindiğim bilgilerden ilham alarak hareket ettiğim Sayın Hocalarım **Prof. Dr. Önder TUZCU** ve **Prof. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU**'na müteşekkirim.

Biyoteknoloji ile beni tanıştıran bugüne kadar gelmeme yardımcı olan Sayın Hocalarım **Prof. Dr. Selim ÇETİNER** ve **Doç. Dr. Yeşim YALÇIN-MENDİ**'nin gayret verici fikirleri ve yararlı önerileri için teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca materyallerimin sağlanmasında yardımcı olan Sayın Hocam **Yard. Doç. Dr. Bilge YILDIRIM**, sevgili arkadaşım **Arş. Gör. Meral İNCESU** ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan sevgili arkadaşlarım **Arş. Gör. Muharrem YILMAZ**, **Zir. Müh. Aydın DEMİREL**, **Biyolog Aşlı AGAR**, **Semra GÖNÜL** ve sevgili kardeşim **Garip Anıl VAROL**'a fedakarlıkları için teşekkür ederim.

Doku kültürü ve *in vitro* muhafaza çalışmalarım sırasında tüm olanaklarını sunan **Toros Agripark** yetkilileri ve mesai arkadaşlarım **Zir. Müh. Belgin BİÇEN**, **Zir. Müh. Sezen İNAN**, **Yük. Zir. Müh. İjlal EKEN** ve **Zir. Müh. Senem İNAN**'a yardımlarını ve desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Verilerimin istatistiksel analizleri sırasında yardımlarından ve değerli önerileri için hocam **Doç. Dr. Sedat SERÇE**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Son olarakta yaşamım boyunca bana gösterdikleri maddi ve manevi fedakarlıkları için **Sevgili Aileme** ve **Eşime** ...

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Genetik Kaynakların Önemi.....	1
1.2. Genetik Kaynaklar Neden Korunmalıdır ve Muhafaza Edilmelidir?.....	2
1.3. Genetik Kaynakların Genel Korunma Yöntemleri Nelerdir?.....	3
1.4. <i>In vitro</i> Muhafaza Yöntemleri.....	4
1.4.1. Bitki Materyalinde Büyümenin Yavaşlatılması veya Azaltılması.....	5
1.4.2. Bitki Materyalinin Soğukta Muhafaza Edilmesi.....	5
1.5. Turunçgiller ve Genetik Kaynaklar.....	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Bitkisel Materyal.....	21
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Doku Kültürü Çalışmaları ve <i>In vitro</i> Muhafaza.....	25
3.2.1.1. Meyve ve Yaprak Örneklerinin Alınması.....	25
3.2.1.2. Kallus Ortamının Hazırlanması ve Meyve Sterilizasyonu.....	25

3.2.1.3. Ovüllerin Kültüre Alınması.....	28
3.2.1.4. Azaltılmış Kültür Ortamının Hazırlanması ve <i>In vitro</i> Muhafaza Koşulları.....	30
3.2.1.5. Muhafaza Sonrasında Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	30
3.2.2. Çalışmada Yapılan Sayım ve Gözlemler	31
3.2.3. Moleküler Analizler.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Ovüllerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları.....	37
4.2. Ovüllerden Elde Edilen Kallus Ağırlık Ortalamaları.....	47
4.3. Elde Edilen Kalluslardan Muhafaza Sonrası Sürgün ve Bitkicik Elde Etme Oranları.....	51
4.4. Oluşan Sürgünlerin Kök Uzunluğu ve Kök Sayıları.....	55
4.5. Oluşan Bitkiciklerden Örneklerin Alınması, Dna İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi ve Dna Miktarlarının Saptanması.....	56
4.6. Rapd Analizleri.....	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	80

KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
4-CPPU	: N-(2-chloro-4-pyridyl)- N'-phenylurea
BAP	: Benzylamino Purine
bp	: baz çifti
BP	: Barba ve Pateña
BH3	: Protoplast kültürü ortamı
cm	: santi metre
dk	: dakika
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EBA	: EME + 0.44 μ M 6-benzilaminopurine (BA) 0.04 μ M 2,4 D
EME	: Malt extract (500 mg.L ⁻¹) içeren Murashige & Tucker ortamı, (Murashige & Tucker, 1969)
EtOH	: Ethanol
g	: gram
GA₃	: Giberillic Acid
kb	: kilobaz
LN₂	: Sıvı Nitrojen
LMr	: MS makro ve mikro, MT vitaminleri ve. amino acidleri ile 1.0 mg/L kinetin ve NAA, 2.0 mg/L BAP and 50 g/L sakaroz içeren ortam
M	: Molar
MB	: 1 mg/L benzylaminopurine (BAP) içeren MS-B5 basal medium
ME	: Malt Extract
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
MT	: Murashige ve Tucker (1969)
NAA	: Naphthalene acetic acid

ng	: nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
rpm	: revolutions per minute
SSR	: Simple Sequence Repeat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
UV	: Ultra Violet
°C	: santigrad derece
μM	: mikromolar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller.....	23
Çizelge 3.2. Çalışmada kallus oluşumu için kullanılan ortam içerikleri.....	26
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan, MS vitaminden modifiye edilmiş MT vitamin içeriği.....	26
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan, MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementleri ve miktarları.....	28
Çizelge 3.5 PCR Reaksiyonunda kullanılan solusyonlar ve miktarları.....	35
Çizelge 3.6 Denemede Kullanılan Primerler ve Baz Dizilişleri.....	36
Çizelge 4.1. I. ve II. yıl denemelerinde kullanılan turuncğil türlerine ait kallus oluşturma oranları ve kallus ağırlıkları.....	41
Çizelge 4.2. Her iki yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	46
Çizelge 4.3. Birinci yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	46
Çizelge 4.4. İkinci yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	46
Çizelge 4.5. Her iki yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	50
Çizelge 4.6. Birinci yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	50
Çizelge 4.7. İkinci yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.....	50
Çizelge 4.8. I. Deneme yılı sonunda genotiplerden kallus yaşlarına göre elde edilen köklenme oranları, kök uzunluğu ve kök sayıları.....	56
Çizelge 4.9. II. Deneme yılı sonunda genotiplerden kallus yaşlarına göre elde edilen sürgün sayıları.....	56
Çizelge 4.10. DNA izolasyonunda kullanılan örneklerin genotipleri, alınma dönemleri, kallus yaşları, uygulama ve elde edilen DNA miktarları...	58

Şekil 3.1. Denemede kullanılan materyallerin ana bitkilerinin görünüşleri; <i>C. medica</i> (a), <i>C. aurantium</i> (b), <i>C. reticulata</i> (c), <i>C. grandis</i> (maxima) (d), <i>C. ichangensis</i> (e), <i>Poncirus trifoliata</i> (f), <i>Fortunella margarita</i> (g), <i>Eremocitrus glauca</i> (h), <i>Microcitrus australasica</i> (ı).....	24
Şekil 3.2. Denemede kullanılan meyveler.....	27
Şekil 3.3. Meyve içerisinde ve karpelde ovüllerin görünüşü.....	29
Şekil 3.4. Meyveden izole edilmiş ovül.....	29
Şekil 3.5. Kültür odasında petrilerin görünüşü.....	29
Şekil 3.6. Elde edilen kallusların deneme boyunca inkübe edildiği inkübatör.....	30
Şekil 3.7. NanoDrop ND-1000 spektrofotometre.....	33
Şekil 3.8. Termocycler.....	35
Şekil 3.9. Elektroforez.....	36
Şekil 3.10. Agaroz gelde koşturulmuş 1 kb DNA markırının bant büyüklükleri.....	35
Şekil 4.1. Roubidox genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	38
Şekil 4.2. Tuzcu 31-31 genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	38
Şekil 4.3. <i>C. celebica</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	38
Şekil 4.4. <i>C. reticulata</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	39
Şekil 4.5. <i>C. ichangensis</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	39
Şekil 4.6. <i>C. medica</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	39
Şekil 4.7. <i>C. grandis</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	40
Şekil 4.8. <i>E. glauca</i> genotipinden elde edilen kallus görünüşü.....	40
Şekil 4.9. I. Yıl denemelerinde kullanılan turunçgil türlerine ait kallus oluşturma oranları.....	42
Şekil 4.10. II. Yıl denemelerinde kullanılan turunçgil türlerine ait kallus oluşturma oranları.....	43
Şekil 4.11. I. yıl denemelerinde kullanılan turunçgil türlerine ait kallus ağırlıkları (g).....	48

Şekil 4.12. II. yıl denemelerinde kullanılan turunçgil türlerine ait kallus ağırlıkları (g).....	49
Şekil 4.13. <i>E. glauca</i> 'nın kalluslarından meydana gelen bitkicikler.....	52
Şekil 4.14. <i>E. glauca</i> 'nın kalluslarından meydana gelen sürgünler.....	52
Şekil 4.15. <i>E. glauca</i> 'nın kalluslarından meydana gelen sürgünler.....	53
Şekil 4.16. <i>E. glauca</i> 'nın köklendirilmiş bitkicikleri.....	53
Şekil 4.17. <i>P. trifoliata</i> 'nın ovüllerinden meydana gelmiş kallus üzerinde sürgün oluşumu.....	53
Şekil 4.18. <i>P. trifoliata</i> 'nın kalluslarından bitkicik oluşumu.....	54
Şekil 4.19. <i>P. trifoliata</i> 'nın kalluslarından oluşan sürgünlerin köklendirilmesi.....	54
Şekil 4.20. <i>P. trifoliata</i> 'dan elde edilen bitkicikler.....	54
Şekil 4.21. <i>C. reticulata</i> (a), <i>E. glauca</i> (b), <i>C. ichangensis</i> (c), <i>P. trifoliata</i> (d) 'tan elde edilen sürgünler.....	55
Şekil 4.22. OPAC 06 primeri ile turunçgil ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	60
Şekil 4.23. OPAK 04 primeri ile turunçgil ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	60
Şekil 4.24. OPAC 11 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	61
Şekil 4.25. OPAC 11 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. ichangensis</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	61
Şekil 4.26. OPAF 04 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	62
Şekil 4.27. OPAF 04 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	62
Şekil 4.28. OPAF 06 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	63

Şekil 4.29. OPAF 06 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	63
Şekil 4.30. OPAF 12 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri	64
Şekil 4.31. OPAF 12 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	64
Şekil 4.32. OPE 02 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	65
Şekil 4.33. OPE 02 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	65
Şekil 4.34. OPE 19 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	66
Şekil 4.35. OPE 19 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	66
Şekil 4.36. OPAC 05 primeri ile <i>E. glauca</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	67
Şekil 4.37. OPAC 05 primeri ile <i>P. trifoliata</i> , <i>C. ichangensis</i> , <i>C. reticulata</i> ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.....	67

1. GİRİŞ

1.1. Genetik Kaynakların Önemi

Çeşitlilik, biyolojik sistemlerin en temel özelliklerinden biridir. Biyolojik çeşitlilik, toplumların ekolojik, ekonomik, kültürel ve manevi zenginlikleri ve geçmişleriyle bağlantısıdır. Büyük önem taşımalarına rağmen, doğal ekosistemler artan nüfus ve doğal kaynak tüketim hızının etkisiyle zarar görmekte, biyolojik ve genetik çeşitlilik çok büyük bir hızla azalmaktadır (**Anonim, 2003**). Yaşama alanını giderek genişleten insanın faaliyetleri sonucunda, büyük bir kısmı henüz hiç tanınmayan, bilinmeyen canlı türleri hızla kaybolmaktadır. Bazı bilim adamları yeryüzünün canlı türleri bakımından hızla fakirleşmesinin doğurabileceği sonuçların nükleer bir savaşın etkilerine yakın olabileceğini öne sürerek dünya çapında tedbirler alınması gerektiğine dikkati çekmişlerdir. Yeryüzündeki canlı türleri sayısındaki azalmanın yol açabileceği tehlikelere karşı dünyayı uyaran bilim adamlarına göre, çağdaş insanın sebep olduğu tür katliamı, yakın jeolojik devirlerde gözlenen tür kayıplarından 400 kat daha hızlıdır ve belki de en az son 65 milyon yıldır bu boyutta bir tür çeşitliliği kaybı görülmemiştir (**Kence, 2005**).

Biyolojik çeşitlilik, canlıların geçirdikleri milyonlarca yıllık evrim sırasında karşılaştıkları sorunlara buldukları çözümlerin, kazandıkları deneyimlerin gen denilen mesajlar olarak kodlandığı büyük bir bilgi birikimine, büyük bir organik kütüphaneye benzetilebilir. Biyolojik çeşitlilik, bir türü meydana getiren bireyler arasındaki kalıtsal farklılıkları içeren **genetik çeşitlilik** ve bunun evrimsel uzantısı olan türlerarası farklılıkların meydana getirdiği **ekolojik çeşitlilik** olarak iki ana kategoride ele alınabilir. Genetik çeşitlilik, bir türün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği, zenginliği olarak tanımlanabilir. Her canlı türünün değişen çevre koşullarına uyum sağlayabilmesi için genetik çeşitliliğe sahip olması şarttır. Yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmayan canlı türleri, değişen çevre koşullarına ayak uyduramayarak yok olmaya mahkûmdur. Genetik çeşitlilik aynı zamanda son yıllarda hızla ilerleyen biyoteknoloji alanında, üstün nitelikli bitki ve hayvan soylarının

geliştirilebilmesi için gerekli hammaddeyi meydana getirmektedir. Ekolojik çeşitlilik ise, belirli bir bölgedeki farklı ekosistemler, tür toplulukları ve bu toplulukların içindeki tür sayıları olarak tanımlanmaktadır. Bir tür topluluğundaki tür sayısı arttıkça, topluluğun enformasyon içeriği, tür çeşitliliği de artmaktadır (**Kence, 2005**).

Doğadaki tür toplulukları gelişigüzel bir araya gelmiş türlerden meydana gelmemektedir. Her topluluk içindeki türler milyonlarca yıllık bir süre içinde birlikte evrimleşerek karmaşık bir ilişkiler ağı ortaya koymuşlardır. Bu sebeple, varlığından dahi haberdar olunmayan ve önemsiz görünen bazı türlerin bu ilişkiler ağından birer birer çekilmeleri bir ekosistemi birdenbire çökme noktasına getirebilir.

Biyolojik çeşitliliğin korunması için gerekçe olarak ekosistem dengesindeki önemi dışında, insanlığın yararı açısından pek çok sebep sayılabilir. Biyolojik zenginlikler tıp, tarım ve endüstride önemli yararlar sağlamaktadır. Biyolojik zenginlikler ileride tarımsal amaçlı biyoteknoloji uygulamalarında gerekli kaynakları oluşturacaktır. Biyolojik zenginliklerin yeterince tanınmaması ve bilinmemesi, bu kaynaklardan yararlanmada biyoteknoloji uygulamalarının sınırlı kalmasına ve bu alandaki yatırımların istenilen verimi sağlayamamasına sebep olabilecektir (**Kence, 2005**). Biyolojik çeşitliliğin korunmasında ekosistemlerin bir bütün olarak korunması temel yaklaşım olmalıdır. Ancak, bu kaynakların yalnızca korunması değil aynı zamanda değerlendirilmesi, sürdürülebilir kullanımı ve kayıt altına alınması ve toplumun da bu kaynakları bilinçli olarak koruması önemlidir (**Anonim, 2003**).

1.2. Genetik Kaynaklar Neden Korunmalıdır ve Muhafaza Edilmelidir ?

Biyoçeşitlilik üzerindeki tahribatların nedenleri arasında:

- Tarımsal etkinlikler (örneğin, meraların tarlaya dönüştürülmesi, aşırı otlatma, anız yakma, aşırı gübre ve ilaç kullanımı, modern çeşitlerin marjinal alanlarda kullanımı)
- Endüstrileşme, şehirleşme ve imar yapılarının artması,

- Doğadan bitki toplama ve doğal kaynakların ihtiyaçların karşılanması amacıyla diğer kullanımları,
- Kontrol dışı ormancılık faaliyetleri ve orman yangınları,
- Turizmdeki gelişmeler,
- Canlı ya da canlı parçalarının patentlenebilir olarak görülmeye başlanması,
- Biyolojik ve genetik çeşitliliğin kontrolsüz ve izinsiz kullanımı gelmektedir (**Anonim, 2003**).

Biyolojik çeşitliliğin bileşenlerinden biri olan genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ekosistemlerin sağlıklı ve verimli olması, sürdürülebilir işletimi için en önemli şartlardan biridir. Tür içi genetik çeşitliliğin yüksekliği, değişen çevre şartlarına uyum açısından önemlidir. Popülasyonlar içi ve arasındaki genetik farklılıklar bitki ve hayvanların kendi çevrelerinde ortak evrimleşmesinin bir sonucudur. Bu çeşitliliğin yapılanmasının ve boyutunun tespiti türlerin işletilmesi açısından zorunludur. Genetik çeşitliliğin yüksek olması iki açıdan önemlidir:

1. Genetik çeşitliliği fazla olan türler zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha başarılı uyum sağlama yeteneğine sahiptir.
2. Genetik çeşitliliği fazla olan türler bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve daha yararlı olurlar (**Anonim 2005**).

1.3. Genetik Kaynakların Temel Korunma Yöntemleri Nelerdir?

Bitki genetik kaynaklarının korunması, gen havuzunda bulunan çeşitliliğin, gerçek ya da potansiyel kullanımına kadar, etkin biçimde saklanması ve genetik çeşitliliğin insanlığın kullanımına sunulmasıdır. Temelde her biri değişik tekniklerin bir araya gelmesiyle oluşan ve *ex situ* ile *in situ* olarak adlandırılan iki temel koruma sistemi vardır.

In situ; ekosistemlerin ve doğal habitatların korunması ve tür popülasyonlarının kendi çevresi içinde canlı olarak saklanıp, devam ettirilmesi ya da kültür çeşitlerinin kendi özelliklerini geliştirdikleri çevre koşullarında yetiştirilmesidir (**Anonim 2005a**).

Ex situ; doğal habitatının dışında ve genel olarak yok olma tehlikesi altında olan genotiplerin korunması olarak tanımlanır (**Rao, 2004**), bazı vejetatif olarak üretilen bitki türlerinin *ex situ* muhafazası için *in vitro* imkanları da bulunmaktadır (**Anonim 2003**). Meyve türlerinin doğal genetik kaynaklarının ulaşılabilirliği, ürün geliştirme ve ıslah çalışmalarına yardımcı olabilir (**Tahir, 2003**). Bitkisel gen kaynaklarının korunmasındaki temel prensipleri, uzun süre depolanabilme, canlılık kayıplarının en az olması, çok sayıda örneğin depolanması, bakım çalışmalarının ve maliyetin düşük olması oluşturmaktadır.

Bitki genetik kaynaklarının korunmasında en yaygın uygulama alanı bulan strateji *ex situ* koruma (tohum depolama, *in vitro* depolama, DNA depolama, çiçek tozu depolama, tarla gen bankası ve botanik bahçeleri) olmuştur. Özellikle modern biyoteknolojide sağlanan gelişmeler, organizmaları tüm olarak değil gen düzeyinde değerlendirmeyi zorunlu hale getirmiştir. Dolayısıyla doğal kaynaklarımızda var olan her türlü canlı organizmanın çalışılmasına gerek vardır. Ülkemizde bu anlamda bir çalışma yapılmamaktadır (**Anonim 2005a**).

1.4. *In Vitro* Muhafaza Yöntemleri

Bitki genetik kaynaklarının muhafazası, bunların arzu edilen bitkisel özellikleriyle ve sürekli *in vitro* üretimleri ile yakından ilişkilidir. Stok kültürler aşağı yukarı optimal koşullarda sürekli altkültür yapılarak uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Ancak büyüme ortamının değiştirilmesi ile (büyümenin hızlandırılması veya yavaşlatılması suretiyle) yapılan altkültür çalışmalarında, ortam değiştirme aralıklarının uzatılması veya alt kültür sayısının arttırılması bazı riskler taşımaktadır. Bunların önemli olanları;

- 1) Somaklonal varyasyonların (kimeralar gibi) ortaya çıkması,

2) Kùltürlerin mikroorganizmalar tarafından kontamine olması,

3) Altkùltürler süresince verimliliğın azalmasıdır.

Germplazm muhafazasında bugün iki temel yöntem uygulanmaktadır;

a) Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması,

b) Bitki materyalinin soğukta muhafaza edilmesi (kryoprezervasyon)

(Emeklier, 2001).

1.4.1 Bitki Materyalinde Büyümenin Yavaşlatılması veya Azaltılması

Yavaş (azaltılmış) büyüme ile muhafazanın esası, bitki kùltürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kùltür ortamının ve kùltür koşullarının değiştirilmesine dayanır. Değıştirilmiş koşullarda büyüme oranı, oldukça düşük olmaktadır. Böyle bir uygulamanın başlıca avantajı ise görünebilir kùltür bozulmalarının kolayca fark edilebilmesidir. Bu sayede canlılık kaybından kaçılabilir (Emeklier, 2001).

Dondurmaksızın depolama; bu tip depolamada, uygulanan normal kùltür sıcaklığı ile muhafaza sıcaklığı arasında bir ilişki vardır. Kùltür sıcaklığı 20-25°C arasında ise muhafaza sıcaklığı 4-10°C arasında olmaktadır. **Büyümeyi engelleyiciler;** büyümeyi kontrol edici veya yavaşlatıcı olarak absisik asit, N-dimetil suksinik asit, manitol kullanımı yaygın hale gelmiştir. Bunun dışında bir kaç yöntem birden kullanılabilir. **Sıvı/katı ortam;** depolama sırasında, sabit çevre sıcaklığında bile buharlaşma nedeni ile sıvı ortamın bileşimi yavaş yavaş değışir. Bitki kùltürü tarafından tüketilen besin maddesinin sıvı besin ortama yeniden ilavesi oldukça kolaydır. Katı ortamda, altkùltür çalışmalarında birçok stres faktörü olmasına rağmen, katılaştırılmış ortamların daha uygun olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Emeklier, 2001).

1.4.2. Bitki Materyalinin Soğukta Muhafaza Edilmesi (Kryoprezervasyon)

Soğukta muhafaza terimi, bitki örneklerinin dakikada birkaç °C, kademe kademe soğutularak muhafazasını ifade eder. Genellikle örnekler dakikada 30-40°C soğutulur ve daha sonra sıvılaştırılmış gazlara (genellikle sıvı azot- LN₂) daldırılarak depolanır. Büyüme ve biyosentetik güçler bu işlemde etkilenmezler (**Emeklier, 2001**).

Fiziksel ve genetik stabilitesi ve ekonomikliği nedeniyle, uzun süreli ve güvenli *in vitro* depolamalar için önerilen bu tekniğin temelini genetik materyalin çok düşük derecede dondurulması oluşturmaktadır. Donma sonucunda kültürde hücre bölünmesi ve buna bağlı olarak genetik değişim tamamen durmakta ve kültür bakım çalışmaları en aza inmektedir. Birçok bitkisel gen kaynağı türü *in vitro* koşullarda dondurma tekniği ile başarılı biçimde depolanabilmektedir. En büyük sakıncası, dondurma ve çözme işlemleri sırasında yapılacak hatalardır. Bu durumda materyalin canlılığının zarar görmesi kaçınılmazdır. Günümüzde bu risk yeterli ekipmanın, geliştirilmiş sistemlerin ve uygun laboratuvar tekniklerinin kullanılmasıyla en aza indirilmiştir. Dondurarak saklama yöntemi için en uygun materyal olarak hücre ya da embriyogenik süspansiyon kültürleri kullanılmaktadır. Embriyogenik kültürlerin rejenerasyon yeteneklerinin yüksek olması dondurarak depolama için iyi bir potansiyel oluşturmaktadır. Saklanacak materyalin dondurulmasında sırasıyla; (a) Bitki doku ve organlarının belirlenerek kültüre alınması, (b) hızlı önbüyütme, (c) donma sırasında kristal yapının oluşmaması ve hücrelerin zarar görmemesi için bir soğuktan koruyucu “cryoprotectant” solüsyonun hazırlanması, (d) yavaş ya da hızlı dondurma, (d) donmuş genetik materyali -196 °C’de sıvı ya da - 150 °C’de gaz halindeki nitrojende depolama, (e) donmuş materyalin ısıtılması ve çözünmesi, (f) çözünme sonrası uygulamalar ile (g) canlılık testleri ve büyümenin başlatılması işlemleri yapılmaktadır. Dondurarak depolama, normal yöntemlerle depolanamayan türlerin doku ve hücre kültürlerinin depolanmasında geleceğe yönelik önemli bir teknik olarak görülmektedir (**Özgen ve ark., 2000**).

1.5. Turunçgiller ve Genetik Kaynaklar

Turunçgiller dünyada ve Ülkemizde en fazla üretilen meyvelerden biridir. Turunçgil üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarımküre’de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarımküre’de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya’da ekonomik olarak üretilmektedir. Dünyadaki en büyük turunçgil üreticisi ülkeler; Brezilya, ABD ve Çin’dir. **2005** yılı itibari ile toplam 107 milyon ton olan dünya turunçgil üretiminin % 44’ü bu üç ülke tarafından karşılanmıştır. Türkiye ise 2.587 bin tonluk üretim miktarı ile 12. sırada yer almakta ve dünya toplam turunçgil üretiminin % 2’sini karşılamaktadır (**Anonim 2006**). Türkiye’de turunçgil üretiminde sürekli artış gözlenmekte ve 2010 yılında toplam üretimin 4 milyon tona ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Türkiye’de oldukça eski bir geçmişe sahip olan turunçgil yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren üretimde önemli artışlar olmuştur. Türkiye turunçgil yetiştiriciliği bakımından ekolojik koşullar açısından son derece uygundur. Turunçgil alanları Ege bölgesi’nde marjinal üretim sınırına ulaşılmış olmakla beraber, Akdeniz bölgesi’nde turunçgil yetiştirilebilecek alanlar turizme açılmıştır.

Turunçgiller, Türkiye yaş meyve sebze ihracatının yaklaşık % 50’sini oluşturmakta ve bu ihracat gelirinin de yaklaşık olarak % 50’si yine turunçgillerden sağlanmaktadır (**Anonim 2002a**).

Tuzcu (2000) turunçgil genetik kaynaklarının değişimi sırasında muhafaza ve güvenliğinin sağlanması amacıyla yapılacak çalışmalarda başarı için ‘Akdeniz’de Turunçgil Sektöründeki İlerlemeler’ üzerine bölgesel projeler hazırlanmasının gerekliliğine değinmiştir. Sağlıklı turunçgil genetik kaynaklarının serbest değişimi

için yaygın muhafaza stratejilerinin ve prosedürlerinin geliştirilmesinin zorunlu olduğunu bildirmiştir.

Küden (2001) genetik kaynakların korunmasının gerekliliğine, genetik materyalin günümüzde ve gelecekte bitki ıslahı için büyük bir değere sahip olduğunu vurgulamıştır. Araştırmacı, uluslararası bir Network'un kurulmasının değerlendirilebilir bitki kaynaklarının muhafazası, toplanması ve tanımlanması için önemli olduğunu da belirtmiştir.

Günümüzde, üstün verimli ve fakat dar genetik tabanlı olan modern çeşitler başta çevresel baskılara (hastalık, zararlı, soğuk ve kurak v.b.) dayanıklılık yönünden gen eksikli olduklarından, ıslahçılar sürekli olarak kalıtsal materyalin yeni kaynaklarını aramaktadırlar. Bu yönden uzun süreli programlarda kantitatif karakterleri; kısa ya da orta süreli programlarda kalitatif karakterleri (hastalıklara dayanıklılık v.b.), aktarmada bitki genetik kaynakları doğrudan ya da köprü türler olarak kullanılırlar (**Anonim 2005a**).

Bitkisel gen kaynaklarının *in vitro* tekniklerle korunması sadece depolama olarak değil, toplama işleminden kullanmaya kadar geçen tüm süreç içerisinde değerlendirilmelidir. Buna göre bitkisel genetik kaynaklar doğal yetiştirilme alanlarından toplanır, toplanan bireyler hastalıklarından arındırılır, hastalıklardan arındırılan bireyler çoğaltılarak sistematik olarak tanımlanır ve muhafaza edilirler. Bundan sonraki aşama ise genetik bankalarında muhafaza edilen materyallerin amaca uygun bir şekilde kullanıcılara ulaştırılmasıdır (**Withers, 1994**).

Turunçgillerde araştırılan uzun süreli muhafaza stratejileri içerisinde; somatik embriyogenesis, 'encapsulation cryopreservation', meristem ve sürgün ucunun soğukta muhafazası ve yine soğukta muhafaza kullanarak tohum muhafaza yöntemlerini geliştirmek yer almaktadır. Embriyogenesis, (gelişmemiş meyvelerden ovuller kullanılarak) poliembriyonik çeşitlerde, tohum ve sürgün ucu cryopreservationu doğal türler ve monoembriyonik çeşitlerde kullanılmaktadır (**Ashmore and Drew, 2003**).

Ülkemizde Turunçgiller bakımından Adana'da Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde ve Antalya'da BATEM (Batı Akdeniz Tarımsal

Araştırma Enstitüsü) olmak üzere 2 önemli koleksiyon bulunmaktadır. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “**Tuzcu Turunçgiller Gen Kaynakları Koleksiyonu**”, içerisinde çeşitli ülkelerden yapılan introdüksiyonlarla birlikte, Ülkemizde yürütülmüş ıslah çalışmaları ile elde edilen genotiplerle uzun yıllar içerisinde oluşturulabilmiş zengin bir yapıya sahiptir. Turunçgil gen kaynaklarının açık koşullarda ya da sera koşullarında canlılıklarının devamı sağlanmaktadır. Bu tür genetik kaynaklar soğuk zararı, değişik patojenlerin neden olduğu hastalıklar ya da diğer doğal felaketler nedeni ile tehlike ile karşı karşıyadır. Diğer bir olumsuz faktör ise bu gen kaynaklarının doğal koşullarda korunması için sürekli bir maddi desteğe ve işgücüne gereksinim duyulmaktadır.

Gerek *in vitro* koşullarda kültüre alarak gerekse diğer yöntemler kullanılarak uzun süreli muhafazaya tabi tutulan bitkisel materyalin genetik stabilitesi çok büyük önem taşır. Ulaşılması hedeflenen amaç genetik kaynakların korunması ise genetik yapının kararlılığı önemlidir. Bu nedenle genetik materyalin uzun süreli muhafazası ile ilgili yapılan pek çok çalışmada muhafaza sonrası elde edilen veya rejenere olan bitkiciklerin sitolojik ve/veya moleküler analizleri gerçekleştirilerek genetik yapının kararlılığı ortaya koyulur. Bu bağlamda moleküler analizlerden en yoğun olarak kullanılan DNA markörleridir.

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “Tuzcu Turunçgiller Gen Kaynakları Koleksiyonun”, içerisinde yer alan bazı turunçgil türlerinde embryogenik kallus eldesi ve bu kallusların *in vitro* koşullarda muhafazası ve muhafaza sonrası bitkiciklerin genetik stabilitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyoteknolojideki gelişmeler genetik kaynakların korunması ve yararlanılması için yeni fırsatlar yaratmıştır. Her ne kadar doğal koşullarda oluşturulan genetik koleksiyonlar ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere korunmuş materyale ulaşım kolaylığı sağlasa da doğal afetler, zararlı ve hastalıklar bu materyalin yok olması riskini taşımaktadır. Bu nedenle yaşayan koleksiyonların güvenlik kopyaları alternatif koruma yöntemleri kullanılarak çıkartılmalıdır. Biyoteknolojik yöntemler içerisinde yer alan doku kültürü teknikleri bu amaca belli başlı avantajlar sunarak hizmet etmektedir (**Rao, 2004**).

Türlere göre değişmekle beraber periyodik alt kültürler, doku kültürü koşullarında 1-15 yıl arasında klonal bitki materyalinin saklanması için olanak sağlar.

Regenerasyon ve kültürlerden genetik olarak kararlı bitkiciklerin eldesi, *in vitro* muhafaza için gereklidir. Genelde organize kültürler yavaş büyütme için kullanılır, çünkü organize olmamış (farklılaşmamış) dokular örneğin kallus, somaklonal varyasyon ile zarar görmesi olasıdır. Yavaş büyütme prosedürleri çok geniş bir çeşit yelpazesi için geliştirilmiş olsa da yalnızca rutin olarak birkaç türün genetik kaynaklarının korunması için kullanılırlar. Yaklaşık olarak 37,600 farklı bitkinin dünya üzerindeki gen bankalarında *in vitro* tekniklerle korunduğu rapor edilmiştir (**Rao, 2004**).

Doku kültürü steril koşullarda gerçekleşmekte ve genetik kaynakların değişiminde ve muhafazasında kolaylıklar sağlamaktadır. Yöntemin en önemli dezavantajı somaklonal varyasyon denilen ve bir tek genden (**Evans ve Sharp, 1983**) kromozom sayısına (**Deng ve ark., 1985; Grosser ve ark., 1997**) kadar etkili olabilen bir olaydır.

Bu tür varyasyonları en az düzeye indirmek için korunmuş genetik materyalin büyümesinin, sıcaklığın düşürülmesi ile yavaşlatılması ya da yapay besi ortamları içerisinde kullanılmakta olan bitki büyümeyi düzenleyici maddelerin daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması gerekmektedir.

Varyasyonu azaltmada kullanılan diğer bir strateji ise non-embriyonik kalluslar yerine embriyonik kallusların bitkisel materyal muhafazasında kullanılması gerekmektedir.

Somaklona varyasyon genelde otsu bitkilerde çok fazla görünmesine karşılık (**Grosser ve ark., 1997**) odunsu bitkilerde daha az görülmektedir. Deng ve ark. (2000) yaptıkları çalışmalarda somaklona varyasyonun özellikle kallus aşamasında ortaya çıktığı ve embriyogenesis aşamasında kaybolduğunu belirtmişlerdir. Embriyogenesis tek hücre kaynaklı olduğu için özellikle kallus aşamasında oluşan genetik varyasyonu yok eder. Bu nedenle non-embriyonik kallus embriyonik kallusa göre daha fazla varyasyon içerir.

Embriyonik kallus eldesi pek çok poliembriyonik çeşit ve türler için zordur. Bu tip kallusların eldesi için gelişmemiş ovül (**Gmitter ve Moore, 1986**) ya da olgun tohumlar (**Deng ve ark., 1988**) kullanılmaktadır.

Withers ve Engelmann (1997) turuncgiller, *Prunus* ve *Vitis* türleri, muz gibi pek çok bitki türünde *in vitro* teknikleri kullanılarak gen kaynaklarının toplanması ve muhafazası üzerine yeni yöntemler geliştirmişlerdir.

Erner ve ark. (1975) portakalın (*C. cinensis*) doku kültüründe gelişimi için ortama portakala ait meyve suyu eklenmesinin gerekliliğini araştırmışlar. Meyve suyunun hücre büyümesi ve hücre bölünmesinde büyüme düzenleyici etkisinin olduğu görülmüştür.

Avenido ve ark. (2005) bitki regenerasyonu ile *in vitro* muhafaza ve çoğaltma denemeleri kurmuşlardır. Mandarinlerden (*C. reticulata*) aldıkları tohumların kabuklarını soyarak sterilizasyona tabi tutmuşlar MB ortamında (MS-B5 + 1mg/l BAP) kültüre almışlar ve 7 gün sonunda çimlenme gözlemişlerdir. Kotiledon ve sürgün uçları yeni MB ortamında kültüre alınmış ve 3 hafta sonunda kesim yerlerinden ortalama 3-5 sürgün meydana gelmiştir. Epikotiller MB ortamında kültüre alınmış ve kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Kalluslardan MG ortamında sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. Sürgünler MB (MS + 30g sakaroz + 2mg/l GA₃) ortamında 30-40 sürgün meydana getirmişlerdir.

Şadok'ta somatik embriyolar olgunlaşmamış tohumların albedo dokularından MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve BP ortamlarında (1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D) meydana gelmiştir. B5, MS, BP ortamlarında 0,5mg/l 2,4-D kullanılarak kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Bu regenerasyon sistemlerinin virüsten ari fidan üretimi, genetik transformasyon, yavaş büyütme ve karyoprezervasyonda yararlı olacağını bildirmişlerdir.

Bordon ve ark. (2000) 4 tür ve bir hibrit turuncgilin epikotil eksplantını kullanarak eksplantın ortama yerleştirilme durumu, hormonlar ve ışığın etkilerini araştırmışlardır. Tüm denemelerde eksplant dikey olarak yerleştirildiğinde kallus oluşturmaksızın direk organogenesis yolu ile sürgünler elde edilmiş, fakat Troyer sitranjı'nın epikotillerini yatay olarak kültüre aldıklarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Direk organogenesis yolu ile sürgün oluşumu karanlık ortamda engellenmiş fakat bu engelleyici faktör sitokinin (BAP) kullanımıyla Troyer sitranjında tam olarak diğerlerinde kısmi olarak ortadan kalkmıştır. Troyer sitranjında organogenik kallus oluşumu sitokinin/oksin dengesi kurulduğunda meydana gelmiştir. *C. macrophylla* karanlık denemesinde kallus oluştururken aydınlıkta oluşturmamıştır. Elde edilen sürgünler NAA ile birlikte düşük dozlarda (2.2-4.4µM) BAP kullanılarak köklendirilmişlerdir. Bu çalışma her genotip için uygun regenerasyon koşullarının optimizasyonunun gerekliliğini ortaya koymuştur.

Kochba ve ark. (1978) embriyogenesis ile ilgili yaptıkları çalışmada Shamouti portakalının nüseller dokularını ve döllenmemiş ovüllerden elde ettikleri kallusları kullanmışlar ve alt kütürler boyunca kallusların oksin ve sitokininlere bağlı olarak gelişimlerini devam ettirdiklerini bildirmişlerdir.

Singh ve ark. (1992) meyer limonundan elde ettikleri nüseller kalluslardan somatik embriyogenesis ve kallus büyümesi üzerine laktoz ve gliserolün teşvik edici etkilerini araştırmışlardır. Laktozun % 5, gliserolün % 2'lik oranları kallus büyümesinde etkili olurken embriyogenesis üzerine gliserolün % 1-4 oranlarının zayıf bir etkisinin olduğu, fakat laktozun % 4-5 oranlarında tüm denemelerde embriyo oluşumu gözlemlenmiştir.

Mendes-da-Gloria ve ark. (1999) yedi farklı turunçgil çeşidinin nüseller dokularından embriyogenik kallus üretmek için 3 farklı büyüme ortamı kullanmışlar. Ortamlar; EME [MT + 500mg/l malt ekstrakt] ; ½ EME (1/2 MT makro elementleri + ½ BH3 makro elementleri + 500 mg/l malt ekstrakt + 1.55 g/l glutamin) ; ve EBA (EME + 0.44 μ M BAP + 0.04 μ M 2,4-D). 120 gün sonunda Crova ve Ponkan

mandarini, Murcott tangoru, Serra d'agua ve Valencia portakallarında yumuşak kırılğan kalluslar elde ederken Natal ve Pera portakallarında kompakt ve kırılğan olmayan kalluslar elde etmişlerdir. EME ve ½ EME ortamları Crova ve Ponkan mandarini, Serra d'agua portakalında en iyi sonucu verirken, Murcott ve Valencia'dan EBA ortamında yumuşak kırılğan kalluslar elde edilmiştir.

Patena ve ark. (2005) Filipinler'de oldukça büyük bir öneme sahip olan Calamansi (*Citrofortunella microcarpa Bunge.*) de somatik embriyo ve bitki regenerasyonu konularını; mikroçoğaltma, genetik transformasyon ve *in vitro* muhafazada kullanılabilirliği için çalışmışlardır. Somatik embriyolar BP, MS (+20 g/l sakaroz + 100 ml/l hindistan cevizi sütü) ortamlarında olgunlaşmamış tohumlardan elde edilen nüseller dokulardan elde edilmiştir. BP ortamında en iyi sonuç elde edilmiş, LMr (MS basal ortamı, 1mg/l kinetin, 1mg/l NAA, 2mg/l BAP, 50g/l sakkaroz) ortamında somatik embriyo oluşumu artmıştır. Gp, Mp, Rp ortamlarında [(Gamborg's B5, MS, BP) + 0,5mg/l2,4-D + 400mg/l glutamin + 60g/l sakaroz + 100ml/l coconut water] somatik embriyolar çoğalmıştır. Somatik embriyolar BP ve MS ortamlarında (20g/l sakaroz + 100 ml/l coconut water) olgunlaşarak 3-5 hafta sonunda bitkiciğe dönüşmüştür. Araştırmacılar mikroçoğaltma, genetik transformasyon, *in vitro* muhafazada kullanılabilecek etkili bir sistem olduğunu bildirmişlerdir.

Perez ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada, 9 mandarin ve mandarin hibritlerinin 6 haftalık gelişmemiş ovüllerden embriyonik kallusları *in vitro* kültür koşullarda elde etmişlerdir. Kültüre alınmış ovüllerden kallus oluşumu taze ortama periyodik olarak altkültürlerin uygun bir şekilde tekrarlanmasının gerektiği bildirilmiş, sonrasında elde edilen embriyonik kallus kültürleri yavaş bir şekilde

soğutulmuş ve daha sonra sıvı azot içerisinde saklanarak hızlıca ısıtmayla eritilmiştir. Muhafaza edilmiş kalluslardan bitkiler embriyogenesis yolu ile elde edilmiş, 8-12 hafta sonunda bitkicik oluşumu gerçekleşmiştir.

Wang ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada LN33 asma hibridi ve Troyer sitranjının sürgün ucu kültürlerinde soğukta muhafazanın iyileştirilmesinde BAP'nın etkilerini araştırmışlardır. LN33 için BAP konsantrasyonun yaşama oranını etkilememesine rağmen, BAP bulunan ortamlarda soğukta muhafazanın ve kontrolün yaşamını devam ettirmesinde etkili olduğunu bildirmişler. Troyer sitranjında da BAP'nin benzer etkisini gözlemlemişler.

Wang ve Deng (2004) bir ticari turunçgil çeşidi olan '439' tangor'u vitrifikasyon uygulamalarında GSH (gultationun azaltılmış formu)'nun yaşama oranını artırıp artırmadığını araştırmak için kullanılmışlar ve GSH'nin cryopreservation sonrası yaşama oranını arttırdığını belirtmişlerdir. Daha sonra bu uygulama 12 farklı turunçgilde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Cho ve ark. (2002) *C. madurensis*'in embriyonik tomurcuklarını 'encapsulation-dehidration' tekniği ile soğukta muhafazaya dayanımını araştırmışlar. 'Encapsulation-dehidrationun' standart uygulamasında % 57.5 yaşama oranı saptanırken araştırmacıların modifiye ettiği uygulamada ise bu oran % 65'e çıkmıştır.

Cho ve ark. (2001) vitrifikasyon uygulamasının kullanıldığı soğukta muhafaza sonrası *C. madurensis*'in embriyonik tomurcuklarının yaşamlarını sürdürebilmelerinde ön büyütme ve ön kültür uygulamalarının ve sürelerinin etkilerini araştırmışlar. Ön geliştirme için 0.1 M'lık sakkaroz içeren ortamda 3 günlük uygulamanın optimum olduğu ifade edilmiş. Ön kültür ise 24 saat 0.3 M sakkaroz ve 0.5 M gliserol ortamında optimal sonuçları vermiştir.

Hao ve ark. (2002) 20 turunçgil genotipinin hücre süspansiyonunu vitrifikasyon yoluyla başarılı bir şekilde soğukta muhafaza etmişlerdir. Cryopreservation sonrası % 90 yaşama oranı gözlenmiş. Cryopreservation sonrası RAPD uygulaması ile genetik stabiliteleri kontrol edilmiş. Ploidy düzeyinde ve genetik olarak stabil oldukları vurgulanmıştır.

Lambardi ve ark. (2004) sıvı nitrojene direkt batırma ve dehidration uygulamasını eşeysel veya nüseller olarak bulunmuş 4 poliembriyonik turunçgil çeşidinin tohumlarında araştırmışlardır. Sıvı nitrojene daldırma uygulaması ile tüm bireylerde oldukça iyi bir yaşama oranı (% 95) gözlemlenmiş. Soğukta muhafaza sonrası elde edilen fidanların SSR analizleri gerçekleştirilmiş ve dehidration/cryopreservation uygulamasının zigotik embriyoların çimlenmesini geliştirdiğini ve tohum başına apomitik fidan sayısının azaldığını göstermiştir.

Begum ve ark. (2004) turunçgillerde kullanılabilecek *in vitro* kültür tekniklerini araştırmışlar kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve *bitki* rejenerasyonunun; sürgün ucu kültürü ve gelişmemiş ovüllerden elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Calovic ve ark. (2000) yapmış oldukları çalışmada 5 farklı limon çeşidinden alınan stiller MT ortamında 5-10 gün sonunda kallus oluşumu, kalluslardan 2-3 ay sonunda somatik embriyo oluşumu gözlemlemişler. Embriyonik potansiyele sahip kalluslar MS ortamında kültüre alınmış ve somatik embriyolardan bitkicik elde edilmiştir.

Wang ve ark. (2000) soğukta muhafazanın uzun süreli muhafazada kullanılabilirliğini araştırmışlar ve turunçgillerin soğukta muhafazasında tohum, ovül, embriyo, embriyonik tomurcuk ve embriyonik kallusların kullanılabileceğini bildirmişler.

Troyer sitranjı (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*)' nın sürgün uçlarının soğukta muhafazası için iki yöntem geliştirilmiş ve karşılaştırılmıştır (Dehidrasyon ve Vitrifikasyon). Encapsüle olmuş sürgün uçları yarı güçte MS ortamında ve 1 M sakkaroz içeren ortamda 4 gün ön kültüre alınmıştır. Kültüre alınma işleminden sonra sürgünlerin suyu uzaklaştırılarak (dehidrasyon işlemine tabi tutularak) direkt olarak sıvı azota daldırılmışlardır. Çözünmeden sonra sürgün uçları canlılıklarını devam ettirmek amacıyla tekrar kültüre alınmışlardır. Vitrifikasyon yönteminde ise dehidrasyonda olduğu gibi ön kültüre alma işlemi gerçekleştirilmiş encapsülasyon olayı ön kültür işleminden sonra gerçekleştirilmiştir. Sürgün uçları daha sonra vitrifikasyon solusyonuna tabi tutulmuş ve en yüksek yaşama oranı % 72 ile 2 saatlik

vitrifikasyon solusyonuna tabi tutulmuş sürgün uçlarında gözlemlenmiştir. Her iki yöntemden rejenere olan bitkiler turunç anacı üzerine aşılanmıştır (**Wang ve ark., 2000**).

Red Marsh altıntopunun embriyonik kallusları *in vitro* koşullarda büyümenin yavaşlatılması yöntemi ile bir yıl saklanmıştır. Somatik embriyolar kontrolden daha kolay rejenere olmuşlardır. Sekiz kallus hattı genetik analiz için kullanılmış, DNA varyasyonunu araştırmak amacı ile RAPD tekniği gerçekleştirilmiştir. 102 pirimer kullanılarak yapılan RAPD çalışmasında DNA düzeyinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (**Hao ve ark., 2004**).

De Carlo ve ark. (2005) karyopreservasyonun turunçgil gen kaynaklarının uzun süreli muhafazasında önemli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Son zamanlarda çok sayıda çalışmanın turunçgil türlerinin *in vitro* kültürlerinden meydana gelen çeşitli doku ve organların sıvı azot (-196 °C) içerisinde saklanabileceğini göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar embriyogenik kallus, somatik embriyo, sürgün ucu, ovül, polen, embriyo ve tohum gibi eksplantların başarılı bir şekilde kullanılabilmesine de değinmişlerdir.

Zhai ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada kültüre alınmış olan dört üzüm ve bir kivi çeşidinin sürgün uçlarını uzun süreli muhafaza etmek amacıyla dondurarak saklamışlardır. Dondurularak saklanmış olan materyallerden rejenere olan sürgün uçlarında RAPD analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen RAPD profillerinde bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, RAPD tekniğinin uzun süreli muhafaza sonucunda elde edilen bireylerde genetik stabilitenin belirlenmesinde hızlı, basit ve etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Dixit ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada ‘encapsulation dehidrasyon’ tekniği ile uzun süreli muhafaza edilmiş *Dioscorea bulbifera* türünün embriyolarından rejenere olan bitkilerde yapmış oldukları genetik analizlerde 10 RAPD primeri kullanmış ve 62 tekrarlanabilir bant elde etmişlerdir. Amplifikasyon ürünleri bir primer dışında monomorfik bulunmuştur. *D. bulbifera*’nın embriyonik kalluslarından elde edilen bitkiler moleküler, biyokimyasal ve morfolojik olarak stabil bulunmuştur.

Sekiz turunçgil akrabalarının olgunlaşmamış tohumlarından elde edilen somatik embriyolardan bitki rejenerasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. Embriyonik kallus hatlarının yalnızca genetik kaynakların *in vitro* koşullarda saklanması değil aynı zamanda *Citrus* ve *Citrus* akrabaları arasında somatik hibridizasyon çalışmalarında yararlı olacağı vurgulanmıştır (**Ling and Iwamasa, 1997**).

Turunçgil genetik kaynaklarının güvenli bir şekilde değişimi ve korunması amacıyla **D’Onghia ve Djelouah (2000)** yaptıkları çalışmada, stigma ve stillerin kültüre alınması ile bitki rejenerasyonu sağlamıştır. Elde edilen bitkiler turunç üzerine aşılanmış ve herhangi bir şekilde gençlik kısırlığı gözlenmemiştir. Embriyogenetik olaydan 3 yıl sonra meyve alınmaya başlanmıştır. Somatik embriyogenesinin bazı virüslerin eliminasyonunda etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Deng ve ark., (2000) 14 turunçgil genotipinin olgun meyvelerinin gelişmemiş ovüllerinden embriyogenik kallus elde etmeyi başarmışlar ve embriyogenik kallusları regenere ederek bu türleri başarı ile koruma altına almışlardır. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada genetik koleksiyonda bulunan 253 bireyi koruma ve saklamaya almadan önce RAPD analizleri ile tanımlamışlardır. Bu çalışmada toplam 190 RAPD primeri kullanılmış ve kullanılan primerlerden 12 tanesi ile çok iyi amplifikasyon elde edilmiştir. Araştırmacılar amplifiye olan 12 primerden 7 primerin belli başlı türlerin ayrılmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Chakravarty ve Goswami (1999) yapmış oldukları çalışmada yabani bir portakal olan *Citrus acida* Roxb. nin *in vitro* koşullarında çoğaltılması ve uzun süreli muhafaza edilmesi amacıyla epikotil eksplantları kullanılarak etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Elde edilen rejenerantlarda olası somaklonal varyasyonu araştırmak amacıyla sitolojik analizler gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar *C. acida*’nın uzun süre (2 yıl) saklanan kalluslarından başarılı bir şekilde sürgün ve daha sonrada bitkicik elde etmişler, bu yöntemle çok küçük bir kallus parçasından çok sayıda bitkicik elde edilebileceğini vurgulamışlardır. Kallus kültürlerindeki virüs konsantrasyonlarının ana bitkiden daha az olduğunu, alt kültür sayısının artması ile virüs konsantrasyonunun azaldığını böylece virüslerden ari bitki elde edildiğini,

yapılan sitolojik analizlerde bitkiciklerin fenotipik olarak aynı olduğu, kromozom sayılarında herhangi bir farklılığın bulunmadığı belirtilmiştir.

Chaturverdi ve Sharma (1987) yapmış oldukları çalışmada *Solanum khasianum*'un 9 yıllık kök kültürleri ile *Atropa belladonna*'nın 5-6 yıllık kültürlerinden elde edilen bitkiciklerde herhangi bir varyasyonun bulunmadığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde turunçgil kültürlerinde rejenere olan bitkiciklerde yapılan analizlerde bitkiciklerin uniform ve genetik olarak stabil oldukları belirtilmiştir (**Kabayashi ve ark., 1984, Germana ve ark., 1994**).

Fiore ve ark. (2002) limon ve portakal türlerinde stigma ve stillerinden kallus oluşumu, somatik embriyo ve bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 2,4-D ve 4-CPPU' nun bulunduğu 16 farklı ortam kullanmışlardır. Somatik embriyo oluşumu 3-5 ay sonra gözlenmiştir. Stillerden en yüksek somatik embriyo oluşum oranı % 16 ile 4M 4-CPPU ortamından elde edilirken, stigmalardan % 24.8 ile yine 4M 4-CPPU ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca limonun embriyogenik potansiyelinin portakaldan daha iyi olduğunu ve somatik embriyolardan yaklaşık 3 ay sonunda bitkicikler meydana (limon;%75, portakal;%53) geldiğini de ortaya koymuşlardır.

Tomaz ve ark. (2001) çalışmalarında 5 turunçgil çeşidinin nüseller dokularından MT + 50 g/l sakaroz ortamından kalluslar elde etmişler ve kalluslardan somatik embriyo eldesi amacı ile MT + 5 farklı karbonhidrat kaynağını kullanmışlardır. 3 çeşitte galaktoz, maltoz ve laktoz içeren ortamda çok sayıda globular safhasında somatik embriyolar ve diğer 2 çeşitte zayıf ve ileriki aşamalarda bitkiciğe dönüşemeyen embriyolar gözlemişlerdir.

Ricci ve ark. (2002) bazı turunçgillerden elde edilen kalluslardan somatik embriyo elde etmede farklı karbonhidratlar denemişler, kültür ortamı olarak MT ortamında sakkaroz, galaktoz, glukoz, maltoz ve laktoz'un 18, 37, 75, 110 ve 150 mM konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Elde edilen embriyolar olgunlaştırılma amacıyla 0.5 g/l aktif karbon bulunan ve 0, 15, 29, 44, 58, 73 mM sakkaroz içeren ortamda kültüre alınmıştır. Kullanılan turunçgil türleri için, kalluslardan embriyo

elde etmede karbonhidrat kaynağı olarak galaktoz ve laktoz en iyi sonuçları vermiştir.

Carimi ve ark. (1999) 3 farklı ortamda 6 farklı turunçgilin pistillerini kültüre almışlardır. 2-5 ay sonunda somatik embriyolar görülmeye başlamış ve somatik embriyolardan da yaklaşık 12 hafta sonunda bitkicikler meydana gelmiştir.

Carimi ve ark. (1998) 11 farklı navel grubu portakalın stil, stigma ve ovüllerinden somatik embriyo ve bitkicikler elde etmişlerdir. 3 farklı ortam kullanmışlar ve 1-3 hafta sonunda somatik embriyoların tüm genotiplerden meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Somatik embriyolardan bitki elde etmek amacı ile MS + ME + şeker içeren ortam kullanılmış ve bitkiciğe dönüşüm oranı ortalama %74 bulunmuştur.

Ramkrishna ve Sanjay. (2005) turunçgil tohumlarının kısa sürede çimlenme yeteneklerini kaybettiğini ve bitkilerden alınacak tomurcukların da hastalık taşıma riski bulunacağından sorunlar yaratabileceğini bildirmişlerdir. Bazı turunçgillerin kotiledon parçalarını MS+ 2 mg BAP + 0.5 mg kinetin + 1 mg NAA içeren ortamda kallus eldesi için kültüre almışlar, daha sonra kallusları muhafaza ederek muhafaza sonrası kalluslardan bitkicikler meydana getirmişlerdir. Meydana gelen bitkiciklerde RAPD analizleri yapılmış ve bitkiciklerde genetik varyasyona rastlamamışlardır.

Embriyonik kallus elde etmeye yönelik turunçgillerde (*Citrus acida*) yapılan çalışmalarda 2,4-D (1mg l^{-1}) ve BAP ($0,5\text{ mg l}^{-1}$) kombinasyonlarında en yüksek kallus oranı gözlenmiştir. 2,4-D'nin bulunmadığı sitokininlerden BAP ve kinetin bulunan ortamlarda kallustan sürgün oluşumu sağlanmıştır. BAP kullanımı ile kalluslar yeşil ve kompakt hale gelmekte 20-25 gün içinde sürgün oluşumu başlamaktadır. Sürgün oluşumu sitokinin konsantrasyonunun $0,5\text{mg/l}$ oranından 1mg/l 'ye artırılması ile artmakta, fakat yüksek sitokinin konsantrasyonu sürgün oluşumunu engellemektedir. Sitokininlerden kinetin sürgün oluşturmada BAP'a göre daha düşük bir oran sergilediği belirtilse de bazı *Citrus* türlerinde sürgün oluşumunda kinetin BA'e göre daha olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (**Chakravarty ve Goswami 1999**).

Dulloo ve ark. (1998) tek bir muhafaza yönteminin hedef türler veya gen havuzundaki genetik çeşitliliği korumada yeterli olamayacağını bildirmişlerdir. *Ex situ* ve *in situ* muhafaza yöntemlerinin birlikte kullanılmasının ve genetik kaynakların muhafazasının optimizasyonu ve tekniklerin geliştirilmesi gerekliliğine değinmişlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “**Tuzcu Turunçgiller Gen Kaynakları Koleksiyonun**”, içerisinde yer alan bazı turunçgil türlerinin *in vitro* koşullarda muhafazası ve muhafaza sonrası bitkiciklerin genetik stabilitelerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Turunçgil gen kaynaklarının geliştirilmesinde üç önemli yaklaşım hedeflenmiştir. 1) uzun süreli muhafaza için embriyogenik kallusların oluşturulması 2) embriyogenik kalluslardan bitki rejenerasyonu 3) regenere olan bitkilerin RAPD markırları ile genetik stabilitelerinin belirlenmesi.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, 2005-2006 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı ile Toros Agripark Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait “**Tuzcu Turunçgiller Gen Kaynakları Koleksiyonun**” içerisinde yer alan ve Çizelge 3.1’de belirtilen turunçgil bireylerinin *in vitro* muhafazası ve moleküler yöntemlerle genetik stabilitenin saptanması çalışmaları yapılmıştır.

3.1. Bitkisel Materyal

Denemelerde kullanılan bitkisel materyallere ait özellikler aşağıda belirtilmiştir.

***Citrus medica* (Ağaç kavunu):** Bu türe ait Tarık Paksoy çeşidi kullanılmıştır. Bitkisel özellikleri; taç yapısına göre gövde ince yapılı, yaprak sapı çok kısa, kanatçık iz şeklindedir. Turunçgiller arasında en ağır meyvelere sahiptir. Meyve eti küçük, kabuk kalındır (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-a**).

***Citrus aurantium* L. (Turunç):** Tuzcu tarafından selekte etmiş olan Tuzcu 31-31 tipi kullanılmıştır. Turunç Akdeniz başta olmak üzere turunçgil üreticisi ülkelerde en çok kullanılan anaçtır. Turunç üzerine aşılı ağaçların ağırca bünyeli topraklarda meyvelerinin kalitesi mükemmel olmaktadır. Kireçli topraklara dayanıklı olan bu anaç bazı limonlar, Satsuma mandarini ve Kamkatlar haricindeki diğer çeşitlerle genellikle iyi bir uyuşma gösterir. Bu özelliklerinin yanında en büyük dezavantajı Göçüren (Tristeza) virüs hastalığına çok duyarlı olmasıdır, *Phytophthora spp*’ya orta düzeyde dayanıklıdır (**Tuzcu ve ark., 1986**). Ağaçları orta veya büyük olabilir. Gençlik döneminde silindirik olarak büyür. Kalın ve sert, sivri dikenleri vardır. Meyveleri orta büyüklükte, pürüzlü ve kaba yapılıdır. Kabuğun kendine özgü bir kokusu vardır (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-b**).

***Citrus reticulata* Blanco (Mandarin):** Mandarin çeşitlerinden ekonomik önemi nedeniyle klemantin (Nules) seçilmiştir. Klemantin, orta boylu, sık taçlı ağaçlar meydana getirir, yaprakları mızrak şeklindedir. Meyvedeki tohum sayısı

tozlanmaya bağılı olarak değişim gösterir ve tohumları monoembriyoniktir. Meyve iriliği küçük ile orta; meyve şekli ise hafif basık ile yuvarlak arasında değişim gösterir. Meyve kabuğu koyu portakal ile kırmızımsı portakal rengine, orta kalınlıkta, yüzeyi düzgün ve parlaktır. Dilim sayısı 8 - 12 adettir. Meyve eti koyu portakal rengine ve suludur. Yabancı tozlanmaya bağılı olarak az veya orta sayıda tohuma sahiptir. Genelde taç sıkı yapılıdır. Sık dallıdır. En çok üretilen mandarin çeşitlerinden biridir (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-c**).

***Citrus grandis* (L.) osb. (Şadok):** Şadoklardan denememizde bitkisel materyal olarak Reinking çeşidi kullanılmıştır. Büyük ağaçları vardır (yaklaşık olarak 10m), yaprakları iri ve geniş kanatlıdır. Genç sürgünleri ve meyveleri hav ile kaplıdır. Meyveleri turunçgiller içerisinde en büyük olanıdır (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-d**).

***Citrus ichangensis* Swing.:** Çevre koşullarına ve soğuğa dayanıklıdır. Turunçgil hastalıklarına karşı dayanımı da vardır fakat Turunçgil göçüren hastalığına (tristeza) karşı duyarlıdır (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-e**).

***Citrus celebica* Koord.:** Yaprakları küçük, doğal yaşama alnında (Karowa) küçük ağaçlar oluşturmaktadır. Çiçekleri 15-17 mm büyüklüğünde, yaprak koltuklarında küme (3'lü veya daha çok) halinde bulunur. Stilleri kısadır (5-6 mm), meyveleri kalın (yaklaşık 3 cm) kabuklu ve büyüktür (10 cm), tohumları küçük ve genellikle monoembriyoniktir.

***Poncirus trifoliata* (L) Raf. (üç yapraklı):** Tipik özelliği üç eşit parçalı yaprağa sahip olmasıdır. Meyveleri küçük üzerileri pürüzlü ve ince küçük hav denilen tüylerle kaplıdır. Kalın sivri dikenleri vardır. Daha çok anaç olarak kullanılır. Diğer bir özelliği tuza ve kirece dayanımıdır (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-f**). Tez çalışması kapsamında Rubidoux trifoliata kullanılmıştır.

***Fortunella margarita* (Lour.) Swing. (oval kamkat):** kamkatlar içerisinde en çok bilinenidir. En önemli özellikleri yapraklarının sapsızmış gibi görünmesidir. Yaprakların alt ve üst renkleri birbirinden farklıdır. Turunçgiller içerisinde en geç çiçeklenenlerdendir (**Tuzcu 2002**), (**Şekil 3.1-g**).

Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing.:** turunçgil türleri içerisinde kserofitik özellik taşıyan tek türdür. Çöl bitkisi gibi özellik gösterir. ***Eremocitrus glauca tek türdür. Avustralya'nın kuzeyinde yer alan çöllerde-steplerde bulunur (Tuzcu 2002), (Şekil 3.1-h).

***Microcitrus australasica* (F. Muell) Swing. (CRC 01), (Şekil 3.1-ı):** Çok zengin bir çeşitlilik gösterir. Meyveler genellikle yuvarlak veya oval-uzun şekilde, meyve kabuğu rengi sarı-beyazdan mora kadar, meyve etini oluşturan meyve suyu keseleri yuvarlaktan ince uzuna kadar değişir. Meyve etinde zamk yapısında bir madde bulunur. Başlıca önemi dayanıklılık ıslahı bakımından tuzluluğa ve kurağa dayanıklıdır (Tuzcu 2002).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller

Eucitrus alt cinsinde yer alan türler
1- <i>Citrus medica</i> (Tarık Paksoy)
2- <i>Citrus aurantium</i> L. (Tuzcu 31-31)
3- <i>Citrus reticulata</i> Blanco (Klemantin Nules)
4- <i>Citrus grandis</i> (L.) osb. (Reinking)
Papeda alt cinsinde yer alan türler
5- <i>Citrus ichangensis</i> Swing.
6- <i>Citrus celebica</i> Koord.
PONCIRUS
7- <i>Poncirus trifoliata</i> (L) Raf. (Robidoux üç yapraklı)
FORTUNELLA SP
8- <i>Fortunella margarita</i> (Lour) Swing.
EREMOCITRUS
9- <i>Eremocitrus glauca</i> (Lindl) Swing.
MICROCITRUS
10- <i>Microcitrus australasica</i> (F. Muell)Swing. (CRC 01)



Şekil 3.1. Denemede kullanılan bitkisel materyallerin ana bitkilerinin görüşleri; *Citrus medica* (a), *C. aurantium* (b), *C. reticulata* (c), *C. grandis* (maxima) (d), *C. ichangensis* (e), *Poncirus trifoliata* (f), *Fortunella margarita* (g), *Eremecitrus glauca* (h), *Microcitrus australasica* (i)

3.2. Yöntem**3.2.1. Doku Kültürü Çalışmaları ve *In Vitro* Muhafaza****3.2.1.1. Meyve ve Yaprak Örneklerinin Alınması**

Turunçgil türlerine ait embryogenik kalluslarının *in vitro* muhafazası için tam çiçeklenmeden 2-8 hafta sonra 0.5-1 cm çapında (Koç ve Kayım, 2000) olan meyveler toplanmıştır (Şekil 3.2). Kültür sonunda elde edilecek olan bitkicikler ile DNA profillerinin karşılaştırılabilmesi için ana bitkilerden genç sürgünlere ait yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri – 80°C koşullarda muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Kallus Ortamının Hazırlanması ve Meyve Sterilizasyonu

Toplanan meyve örnekleri kültür öncesi yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Yüzey sterilizasyon aşamasında meyveler, 3 dk %70'lik EtOH ardından 10 dk. %10 sodyum hypoklorit + 1-2 damla Tween-20 içerisinde bekletilmiştir ve steril saf su ile çalkalanarak sterilit maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kültür ortamı olarak Marin ve Duran (1992)'ın izledikleri yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre MS tuzları (1962, Çizelge 3.2) + MT vitamin (1969, Çizelge 3.3) + 50 g/l Sakaroz + 500mg/l Malt Ekstrakt ve 10 g/l Agar içeren ve BA'nın kullanılmadığı kontrol ve BA'nın 2 farklı konsantrasyonunu (0,5mg/l ve 1 mg/l) içeren besi ortamları kullanılmıştır. Kullanılan tüm ortamlara 1 mg/l 2,4 D eklenmiştir. Hazırlanan ortamlar 121°C'de 1.05 atm. basınç altında 15 dk otoklav edilerek sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Otoklav sonrası ortamlar petri kaplarına dökülmüştür.

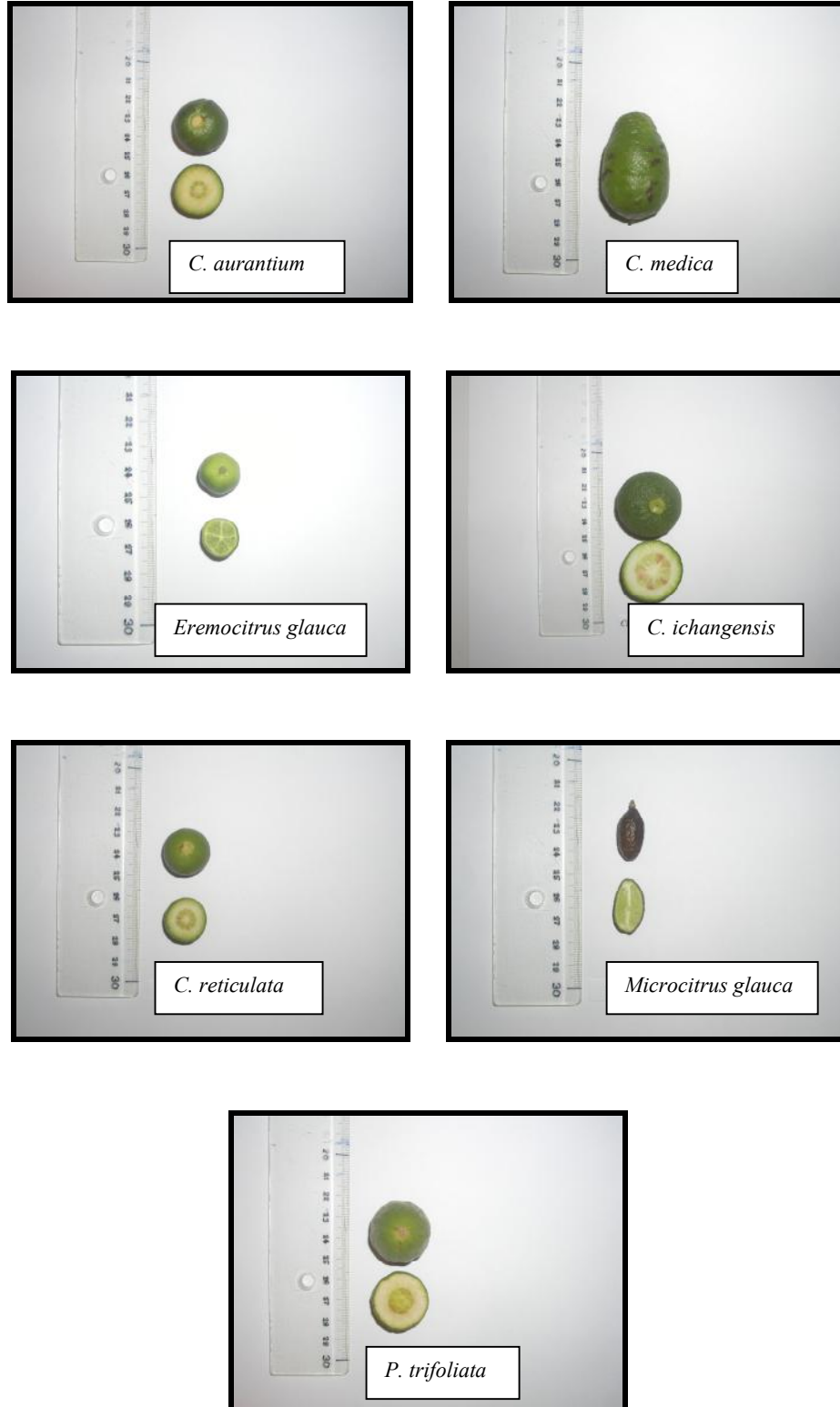
Çizelge 3.2 Çalışmada kallus oluşumu için kullanılan ortam içerikleri

Ortam içeriği	Uygulamalar		
	I. uygulama	II. uygulama	III. uygulama
MS tuzları	+	+	+
MT vitaminleri	+	+	+
Malt ekstrakt	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
Sakaroz	50 g/l	50 g/l	50 g/l
2,4-D	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
BAP	-	0.5 mg/l	1 mg/l
Agar	10 g/l	10 g/l	10 g/l
PH	5.7	5.7	5.7

- I. uygulama : Kontrol ortamı (BAP içermeyen ortam)
 II. uygulama : 0.5 mg/l BAP içeren ortam
 III. uygulama : 1 mg/l BAP içeren ortam

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan, MS vitaminden modifiye edilmiş MT vitamin içeriği.

Vitamin	MS (1962) ortamı mg/l	MT (1969) ortamı mg/l	Moleküler ağırlık (g)
Glycine	2.0	2.0	75.05
Myo-Inositol	100	100	180.2
Nicotinamide	0.5	5.0	123.1
Pyridoxine HCL	0.5	10.0	205.6
Thiamine HCL	0.1	10.0	337.3



Şekil.3.2. Denemede ovülleri izole edilmek üzere toplanan meyveler

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan, MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementleri ve miktarları

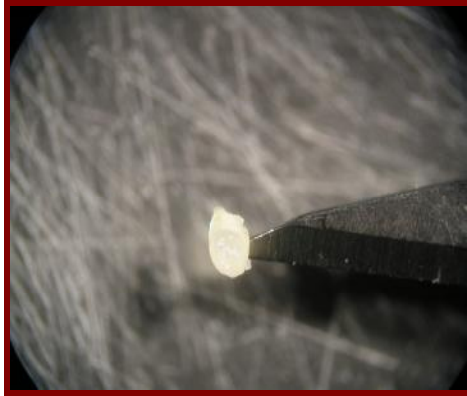
Bileşik	Konsantrasyon (mg/l)
Makro Elementler	(MS, 1962)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	(MS, 1962)
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .H ₂ O	15,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KI	0,83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3

3.2.1.3. Ovüllerin Kültüre Alınması

Steril edilen meyvelerden steril kabin içerisinde, mikroskop altında steril pens ve bistüri yardımı ile ovülleri izole edilerek kültüre alınmıştır (Şekil 3.3, Şekil 3.4). 25 ml besi ortamı içeren her petride 10 ovül kültüre alınmış ve 27°C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5). Kültüre alınan eksplantlardan 30-60 gün sonunda kallus oluşumları gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Meyve içerisinde ve karpelde ovüllerin görünüşü



Şekil 3.4. Meyveden izole edilmiş ovül.



Şekil 3.5. Kültür odasında petrilerin görünüşü

3.2.1.4. Azaltılmış Kültür Ortamının Hazırlanması ve *In Vitro* Muhafaza Koşulları

Elde edilen kalluslar başlangıçta kallus oluşumu için kullanılan ortamın yarı gücünde ($\frac{1}{2}$ MT ortamında) ortamda 10°C’de ve karanlık koşullarda muhafaza edilmişlerdir. Koşulları sağlayabilmek için sıcaklık ve ışıklandırılması ayarlanabilen inkübatör kullanılmıştır (Şekil 3.6). Muhafaza süresince 30 günde bir (30, 60, 90 gün) kültürler yapılmış ve muhafaza ürünlerinden sürgün elde etme olanakları araştırılmıştır.



Şekil 3.6.Elde edilen kallusların deneme boyunca inkübe edildiği inkübatör

3.2.1.5. Muhafaza Sonrasında Kalluslardan Sürgün Oluşumu ve Sürgünlerin Köklendirilmesi

Oluşan embriyonik kallusların bir kısmı 1mg/l BA+ GA₃ (0.1mg/l) içeren MT ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sürgünlerin köklenmesi amacıyla **Chakravarty ve Goswami (1999)**’nın en iyi buldukları NAA (0.5mg/l) içeren

köklendirme ortamında bitkicikler köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkilerde farklı kallus yaşlarından oluşturulan bitkiciklerde varyasyonu saptamak için RAPD analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Çalışmada Yapılan Sayım ve Gözlemler

Her tür için 10 ovül/petri olacak şekilde toplam 10 petri, 3 kallus ortamı, böylece her ortam için 10 tekerrür kullanılmıştır. Elde edilen kallusların yaş ağırlıkları ile kallus yaşlarına göre (30, 60, 90 günlük kalluslar) her tür için sürgün ve bitkicik elde etme oranı belirlenmiştir. Kallus yaş ağırlıkları 0.0001 g hassasiyete sahip terazide tartılarak belirlenmiştir. Sürgün oluşum oranları hesaplanırken ise her uygulama için kültüre alınan tüm kalluslardan oluşan sürgün sayıları kullanılmıştır. Sürgünler köklendirme ortamına transfer edilmiş ve elde edilen bitkiciklerde köklenme yüzdesi, (köklenen bitki/sürgün) kök uzunluğu (cm) ve sayısı (adet) tespit edilmiştir.

Kallus oluşum oranları; deneme 10 farklı genotip için 10 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 ovül olacak şekilde 3 farklı uygulamalı olarak kurulmuş, dolayısıyla her uygulamada toplam 100 ovül kullanılmıştır. Kallus oluşum oranı; bir uygulamada bulunan her tekerrürden meydana gelen kallus oluşumları alınarak, o uygulamaya düşen ortalama kallus oluşumu olarak hesaplanmıştır.

Kallus ağırlık ortalaması; kallus oluşum oranında olduğu gibi her tekerrürden meydana gelen kallus ağırlıklarının toplamı kullanılarak o uygulamaya düşen ortalama kallus ağırlığı olarak hesaplanmıştır.

Deneme sonucunda elde edilen veriler SAS (SAS, 1990) programı kullanılarak varyans analiz testlerine tabi tutulmuşlardır. Başlangıç olarak kallus oranı ve kallus ağırlığı verileri yıl, uygulama (büyütme ortamları; kontrol, 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l BAP) ve tür faktörleri kullanılarak karışık (mixed) modele göre uygulamanın sabit (fix) öteki faktör ve interaksiyonların tesadüfi (random) varsayıldığı modele göre analiz edilmişlerdir. Sonuçlar, her iki değişken için de yıl faktörü ve yıl faktörünün öteki faktörlerle olan interaksiyonlarının önemli çıktığını

göstermiştir. Bu yüzden değişkenlerin yıllar bazında ayrılarak analiz edilmesine karar verilmiştir.

Denemede ele alınan değişkenler uygulama, tür, tür x uygulama ve hata bileşenlerini içeren varyans analiz tablolarında değerlendirilmiştir. Yine karışık model kullanılırken uygulama sabit etki tür ve tür x uygulama etkisi ise tesadüfi olarak varsayılmıştır. Uygulama ve tür, tür x uygulama interaksyonuyla test edilirken, tür x uygulama faktörü denemenin genel hatası ile test edilmiştir.

3.2.3. Moleküler Analizler

In vitro koşullarda kültüre alma işleminden önce, materyallerin ana bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak -80°C’de muhafaza edilmiştir. Kallus kültüründen elde edilecek bitkiciklerde devam eden alt kültürler boyunca açılımların tespit edilmesi için ana bitkiden ve *in vitro* örneklerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve DNA yapıları karşılaştırılmıştır.

Yaprak örneklerinden DNA izolasyonunda Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A.) kullanılmış ve DNA izolasyonu firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. (http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/GenomicDNAStabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantIssues/DNY_Plant/1037952_HB_DNY_Plant_06_2006_Web.pdf).

Ekstrakte edilmiş DNA’ların konsantrasyonları ve saflıkları NanoDrop (Şekil 3.7) ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. NanoDrop ND-1000 spektrofotometre

Qiagen DNA izolasyon kitinde aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- Alınan bitki örnekleri seramik havanlarda sıvı azot içerisinde öğütülür ve 0.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılır.
- 100 mg taze veya 20 mg kuru dokuya 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase solusyonu eklenir ve vorteks ile karıştırılır.
- Karışım 10 dk 65°C'de inkübe edilir. Tüpler bu süre içerisinde 2-3 kez çalkalanır.
- Daha sonra üzerine 130 µl Buffer AP2 eklenir ve karıştırılır, ardından 5 dk buz üzerinde bekletilir.
- 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir, santrifüj sonrasında süpernatant Qiashared spin kolonuna aktarılır.
- Kolon 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilir ve 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edilir.
- Oluşan sıvı kısım pellete karıştırılmadan yeni bir ependorf tüpüne aktarılır. (bu aşamada yaklaşık olarak 450 µl lisate elde edilir)
- Üzerine 1.5 hacim (675 µl) Buffer AP3 eklenir ve elle karıştırılır.

- Elde edilen karışımdan 650 µl 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirdiğimiz DNeasy mini spin kolonuna yerleştirilir ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edilir ve sıvı kısım atılır.
- Kolona karışımdan kalan kısım eklenir ve bir önceki aşama tekrarlanır. Ardından sıvı kısım ve toplama tüpü atılır.
- Kolon yeni bir toplama tüpüne konulur ve 500 µl Buffer AW eklenir. 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edilir, sıvı kısım atılır ve toplama tüpü sonraki aşamada tekrar kullanılır.
- Kolona 500 µl AW Buffer eklenir ve membranın kuruması için 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edilir, kolon toplama tüpünden nazikçe çıkarılır ve sıvı kısım atılır.
- Kolon 1.5 veya 2 ml santrifüj tüplerine yerleştirilir, üzerine önceden ısıtılmış (65°C) 40 µl Buffer AE direk olarak membran üzerine eklenir 5dk oda sıcaklığında bekletilir 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edilir, ardından tekrar 40 µl Buffer AE eklenir ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilir ve tekrar 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edilir. Elde edilen ürünlerin DNA miktarları spektrofotometrede okumaları yapılarak saptanır ve örnekler -20°C'de muhafaza edilir.

Bitkisel materyallerden izole edilen DNAlar sentetik olarak hazırlanmış ve Operon Technologies (Alameda, CA) firmasından temin edilmiş RAPD primerleri (21 adet) (Çizelge 3.4) ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek termocycler (Şekil 3.8) içerisine yerleştirilmiştir. Kullanılan RAPD daha önce turuncgillerde polimorfik olarak belirlenmiş primerlerdir (**Deng ve ark., 2000; Bastianel ve ark., 2006; Kaçar ve ark., 2005**). Reaksiyon ve PCR koşulları Çizelge 3.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

RAPD analizlerinde agaroz gel elektroforez (Şekil 3.9) sonucunda her bir primer için bantların değerlendirilmesinde 1 kb DNA markır kullanılmıştır (Şekil 3.10). Elde edilen PCR ürünleri [20 µl PCR reaksiyonu için 8 µl yükleme bufferı (% 40 sukroz, 10 mM EDTA, % 25 bromofenol blue) eklenmiş], % 1.5'luk agarose

jelde, 1 x TAE (Trizma Basse, Glacial Acetic Acid, EDTA) buffer eklenerek, 3 saat süre ile 70 Volt'ta kořturulmuřtur.

Elektroforez işleminden sonra jel % 0.1'lik ethidium bromide solusyonu (10mg/ml) içerisinde yaklaşık 30 dk. bekletilmiş ve UV altında fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 3.5 Denemede Kullanılan Primerler ve Baz Dizilişleri.

Primer kodu	Baz dizilişi (5' _ 3')	Kaynak	Primer kodu	Baz dizilişi (5' _ 3')	Kaynak
OPAA07	CTACGCTCAC	1	OPE05	TCAGGGAGGT	1
OPAA17	GAGCCCGACT	1	OPE09	CTTCACCCGA	2
OPAC05	GTTAGTGCGG		OPE13	CCCGATTCTGG	2
OPAC06	CCAGAACGGA	2	OPE19	ACGGCGTATG	2
OPAC11	CCTGGGTCAG	2	OPB04	GGACTGGAGT	3
OPAC16	CCTCCTACGG	2	OPB13	TTCCCCCGCT	3
OPAF04	TTGCGGCTGA	2	OPB18	CCACAGCAGT	3
OPAF06	CCGCACTCTG	3	OPU02	CTGAGGTCTC	2
OPAF12	GACGCAGCTT	3	OPU17	ACCTGGGGAG	2
OPE01	CCCAAGGTCC	2	OPAK04	AGGGTCGGTC	3
OPE02	GGTGCGGGAA	2			

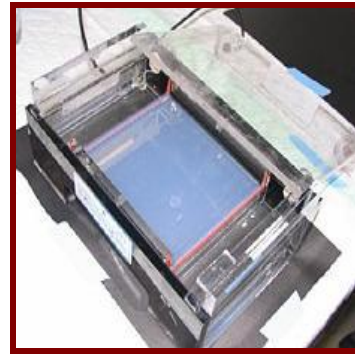
1: Deng ve ark., 1999

2: Kaçar ve ark., 2005

3: Bastianel ve ark 2006



Şekil 3.8. Termocycler



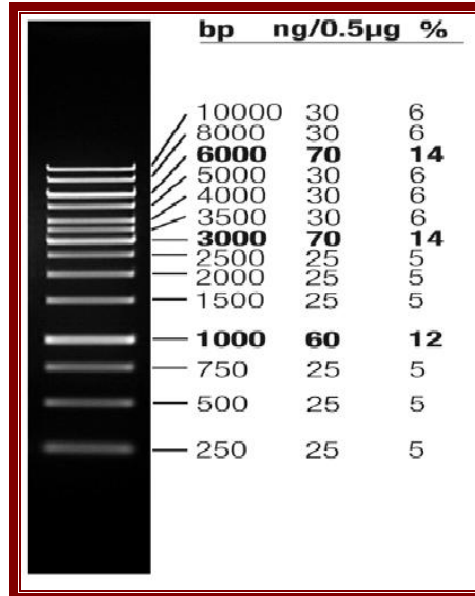
Şekil 3.9. Elektroforez

Çizelge 3.6. PCR Reaksiyonunda kullanılan solusyonlar ve miktarları

Solusyonlar	Tek örnek için kullanılan miktar
PCR Master Mix (Fermentas)	6.25 µl
Primer (30 ng)	1.25 µl
MgCl ₂ (25mM) 2 mM	0.5 µl
Taq DNA Polimeraz (1 ünite)	0.05 µl
ddH ₂ O	1 µl
DNA	15 ng

PCR koşulları

94°C 2 dk	ön denatürasyon	
94°C 2 dk	denatürasyon	} 55 döngü
37°C 1 dk	annealing	
72°C 2 dk	polimerizasyon	
72°C 10 dk	son yazılım	
4°C ∞		



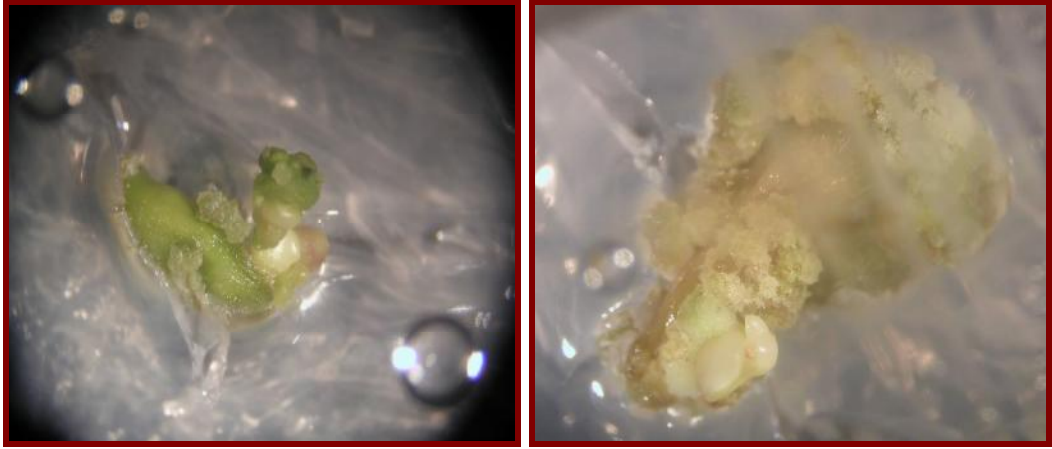
Şekil 3.10. Agaroz gelde koşturulmuş 1 kb DNA markırının bant büyüklükleri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**4.1. Ovüllerden Elde Edilen Kallus Oluşum Oranları**

Embriyogenik kalluslar tam çiçeklenmeden 2-8 hafta sonra kültüre alınan ovüllerden elde edilmişlerdir. Embryogenik kalluslar beyaz/kremsi renk ve kırılgan yapılarıyla diğerlerinden ayırt edilmişlerdir (Şekil 4.1-4.8) . *Microcitrus australasica* ve *Fortunella margarita* türlerinde istenilen kalitede embriyogenik kalluslar elde edilemediği için bu türler istatistiksel analizlere dahil edilmemişlerdir.

Denemede kullanılan turunçgil türlerine ait kallus oluşum oranları incelendiğinde; I. yıl denemelerinde, en fazla kallus oluşum oranı *C. aurantium* (% 52) ve *P. trifoliata* (% 40) türlerinde olmuştur. Kallus oluşturma oranı bakımından söz konusu bu iki türü *C. grandis* (% 27) ve *C. celebica* (% 22) izlemiştir. En düşük kallus oluşturma oranı % 9 ile *C. medica*' da gerçekleşirken, *C. ichangensis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.9;).

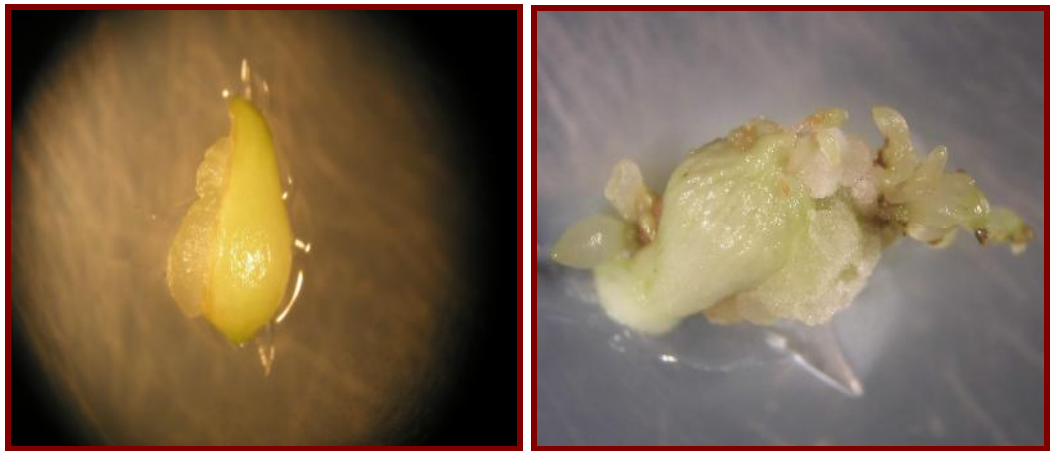
II. Yıl denemelerinde kallus oluşturma oranları incelendiğinde, *C. ichangensis* ve *C. grandis* türleri dışında I. yıl denemelerine paralel sonuçlar elde edildiği gözlenmektedir. Şekil 4.10'dan de izleneceği üzere II. yıl denemelerinde I. Yıl denemelerinde olduğu gibi en yüksek kallus oluşturma oranı *C. aurantium* (% 52) türünden elde edilmiş bunu % 40 kallus oluşturma oranı ile *P. trifoliata* izlemiştir. *C. ichangensis* türüne ait eksplantlardan % 32 oranında, *C. reticulata* türünden ise % 29 oranında kallus elde edilmiştir. En düşük kallus oluşturma oranı I. Yıl denemelerindeki gibi % 5 ile *C. medica*'da gerçekleşmiştir. *C. grandis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).



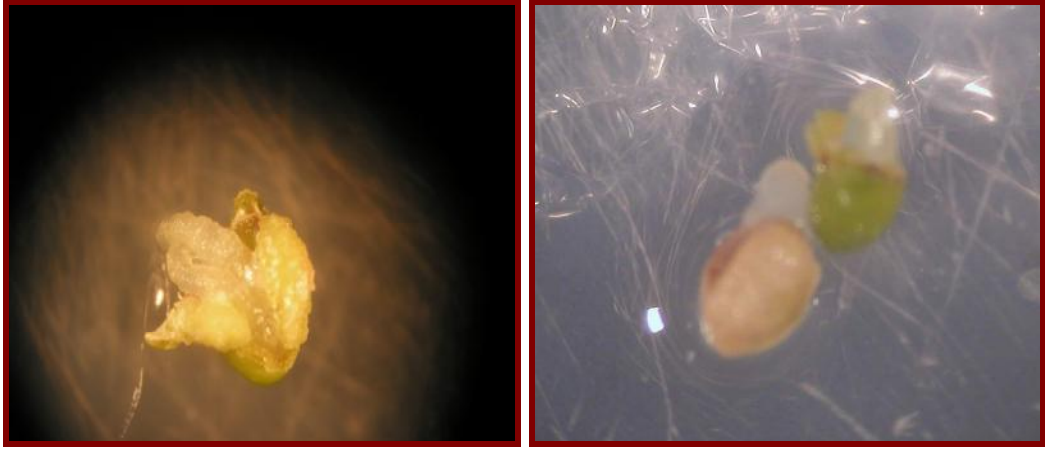
Şekil 4.1. *P. trifoliata* genotipinden elde edilen kallus görünüşü



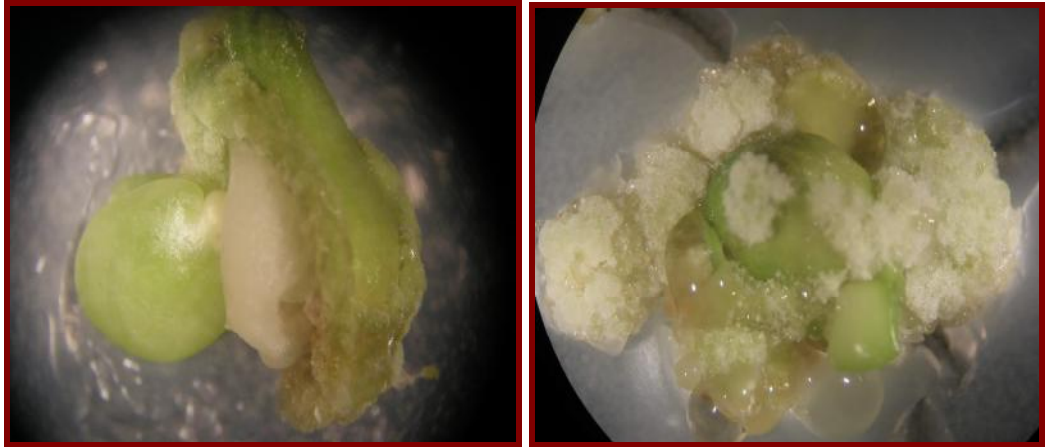
Şekil 4.2. *C. aurantium* genotipinden elde edilen kallus görünüşü



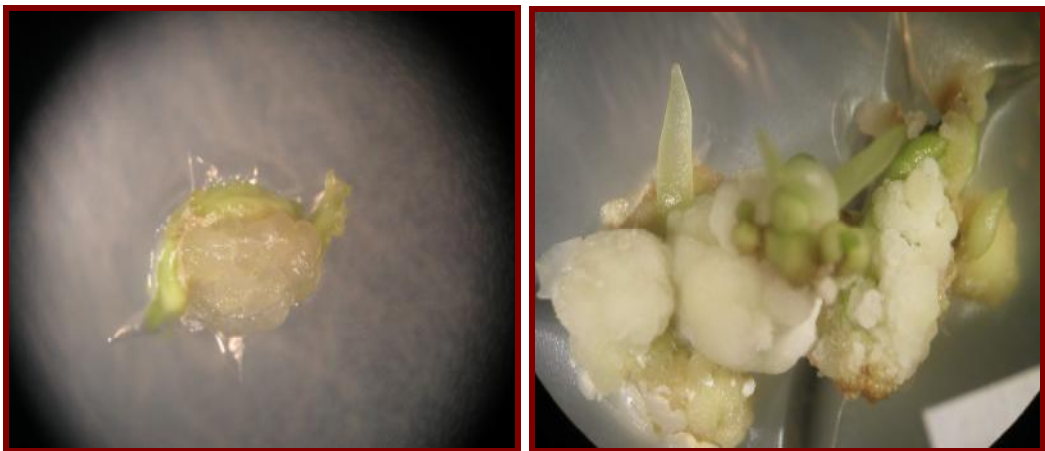
Şekil 4.3. *C. celebica* genotipinden elde edilen kallus görünüşü



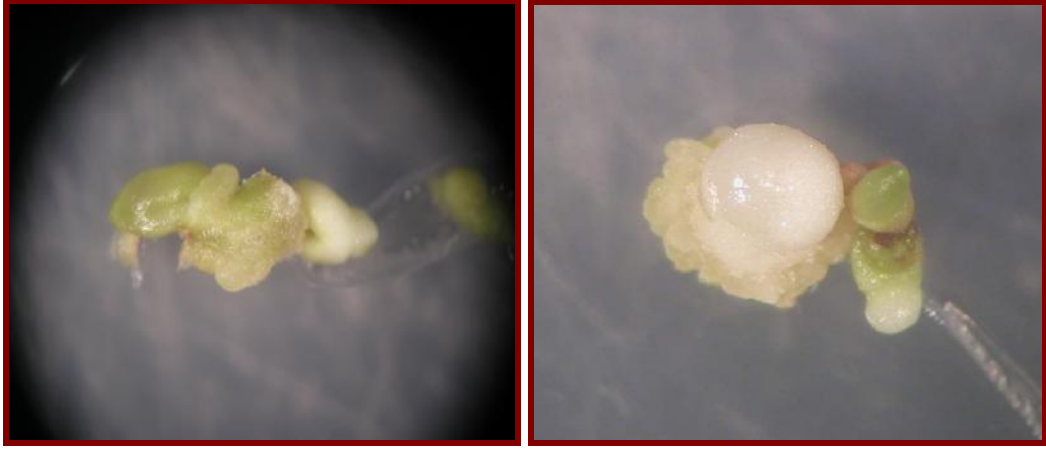
Şekil 4.4. *C. reticulata* genotipinden elde edilen kallus görünüşü



Şekil 4.5. *C. ichangensis* genotipinden elde edilen kalluslar



Şekil 4.6. *C. medica* genotipinden elde edilen kalluslar



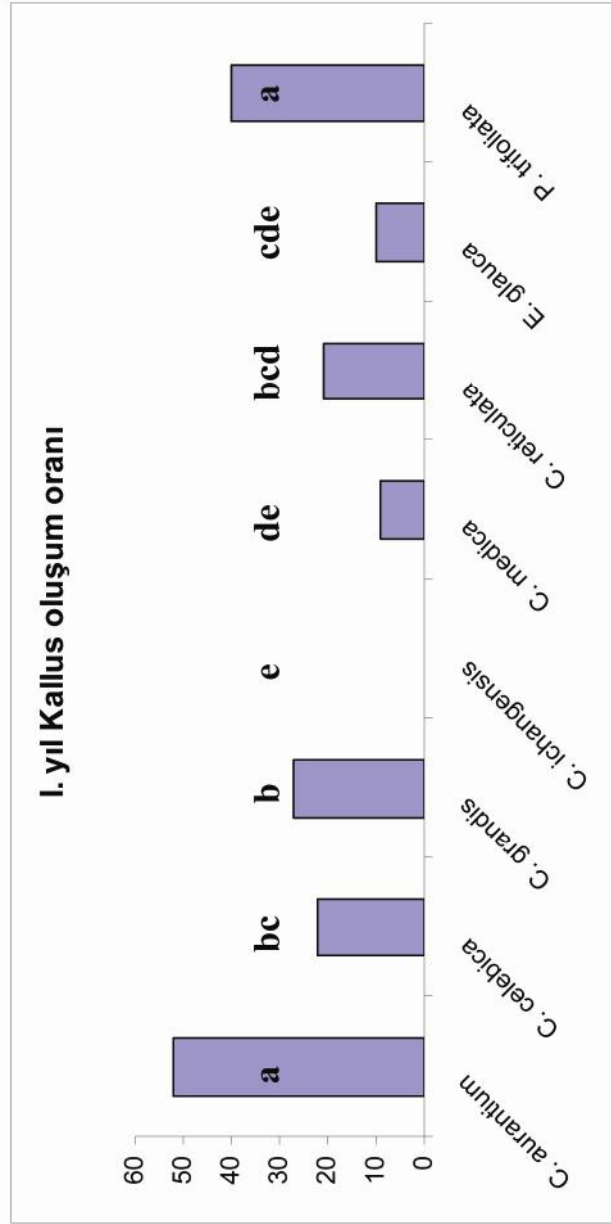
Şekil 4.7. *C. grandis* genotipinden elde edilen kalluslar



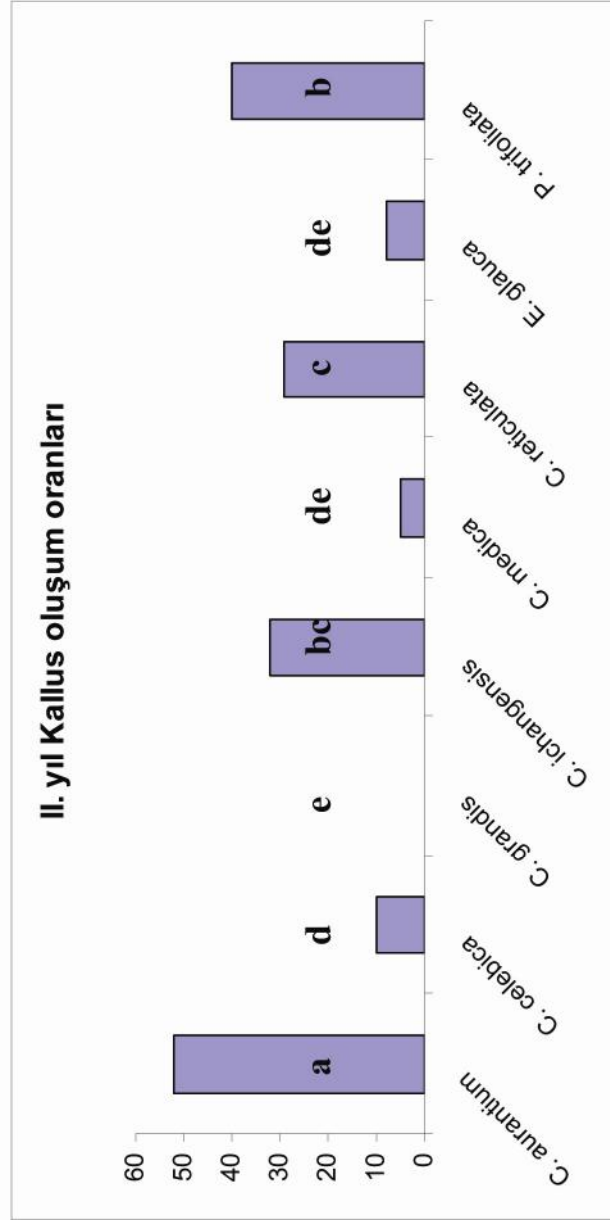
Şekil 4.8. *E. glauca* genotipinden elde edilen kallus

Çizelge 4.1. I. ve II. yıl denemelerinde kullanılan turuncgil türlerine ait kallus oluşturma oranları ve kallus ağırlıkları

Tür	Yıl I		Yıl II	
	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus ağırlığı (g)	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus ağırlığı (g)
<i>C. aurantium</i>	52 a	0,90 a	52 a	0,55 a
<i>C. celebica</i>	22 bc	0,21 b	10 d	0,11 bc
<i>C. grandis</i>	27 b	0,34 b	0 e	0,00 c
<i>C. ichangensis</i>	0 e	0,00 b	32 bc	0,24 b
<i>C. medica</i>	9 de	0,04 b	5 de	0,04 bc
<i>C. reticulata</i>	21 bcd	0,06 b	29 c	0,05 bc
<i>E. glauca</i>	10 cde	0,05 b	8 de	0,05 bc
<i>P. trifoliata</i>	40 a	0,85 a	40 b	0,25 b



Şekil 4.9. I. Yıl denemelerinde kullanılan turuncgil türlerine ait kallus oluşturma oranları



Şekil 4.10.. II. Yıl denemelerinde kullanılan turuncgil türlerine ait kallus oluşturma oranları

Materyal ve Yöntem bölümünde de açıklandığı üzere kallus oluşturma oranları hesaplanırken her petride kültüre alınan on ovülden elde edilen kallus miktarları dikkate alınmıştır. Yukarıda sunulan veriler % ile ifade edildiğinde I. yıl için kallus oluşumları % 52 ile % 9 arasında değişirken, II. yıl denemelerinde % 52 ile % 5 arasında değişmiştir. I. Yıl denemelerinde *C. ichnangensis*, II. yıl denemelerinde *C. grandis* türlerinden kallus elde edilememesinin nedeninin istenilen özellikte meyve bulunamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kallus oluşturma oranları bakımından Citrus alt cinsinde yer alan türler incelendiğinde I yıl % 52 (*C. aurantium*) ile % 9 (*C. medica*), II.yıl ise % 52 (*C. aurantium*) ile % 5 (*C. medica*) arasında değişen kallus oluşumları dikkati çekmektedir. Papeda alt cinsinde yer alan *C. ichangensis* ve *C. celebica* türlerinde II. yıl sonuçları karşılaştırıldığında ise sırasıyla % 32 ve % 10 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Yukarıdaki veriler dikkate alındığında aynı alt cins içinde yer alan genotipler için benzer sonuçlar elde edilemediği söylenebilir.

Her iki yılda da *M. australasica* ve *F. margarita* türlerinden embriyogenik kallus elde edilememesinin nedeni bu türlerin kullanılan eksplante (ovül) ya da kültüre alındığı besi ortamına tepki vermemesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Carimi ve ark. (1998) Navel grubundan 11 portakal çeşit ve tipi ile yapmış oldukları çalışmada stigma/stil ve ovul eksplantları kullanmışlardır. Kültürden 4 hafta sonra eksplante tepki verme ve hücre bölünmesi başlamasının en iyi olduğu ortam; MS basal ortamı, Malt ekstrakt ve 13.3 µM BAP içeren besi ortamı ve en olumlu tepki veren eksplant stigma/stil eksplantı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar embriyogenik tepkinin en iyi olduğu eksplantın ovul olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada portakal genotiplerinden elde edilen embriyogenik kallusların oranının % 30.8 olduğu bildirilmiştir. Bu değer tez çalışması kapsamında Eucitrus alt cinsinde yer alan genotiplerin ortalamalarından daha yüksek bir değerdir. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın genetik farklılıktan veya ekplantın alınma şeklinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, embriyogenik kallus elde etmek amacıyla kullanılan ovüllerin integümentleri uzaklaştırılmadan kültüre alınmıştır. Oysaki araştırmacılar ovul integümentlerinin uzaklaştırılarak

nucellus ile besi ortamının temasının sağlanmasının önemli olduğunu vurgulamaktadırlar. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında 4 aylık meyvelerin ovüllerini kullanırken araştırmamızda 2 aylık meyveler kullanılmıştır.

Turunçgil türlerinden embriyogenik kallus eldesi amacıyla kültüre alınan eksplantlerin kallus oluşturma oranlarına ilişkin varyans analiz tabloları Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4’de sunulmuştur. Her iki yıldaki veriler kullanılarak oluşturulan varyans analiz tablosunda tür, Yıl X Tür interaksiyonun önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.2). Birinci yıl ve ikinci yıl verileri ayrı ayrı dikkate alındığında yalnızca türlerin kallus oluşturma oranları bakımından istatistiksel olarak farklı olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4).

Uygulamalar, arasında herhangi bir farklılığın olmaması kallus oluşturma ortamında kullanılan BA’nin kallus oluşumuna etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

Chakravarty ve Goswami 1999 embriyonik kallus elde etmeye yönelik *Citrus acida* türünde yaptıkları çalışmada 2,4-D (1mg l^{-1}) ve BAP ($0,5\text{ mg l}^{-1}$) kombinasyonlarında en yüksek kallus oranı gözlenmiştir. BA miktarının düşük kullanılması *in vitro* muhafaza sırasında genetik kararlılığın sağlanması açısından önemlidir. Yüksek dozda kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri bitkilerde varyasyonların oluşmasına neden olur.

Çizelge 4.2. Her iki yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Yıl (Y)	1	2,3	2,3	0	0,964
Tekerrür/Y	18	19495,7	1083,1	4,12	0,000
Uygulama (U)	2	549,1	274,5	1,04	0,353
Tür (T)	7	77106,5	11015,2	41,88	0,000
Y x U	2	654,0	327,0	1,24	0,290
Y x T	7	29047,6	4149,7	15,78	0,000
Y x U x T	28	7725,9	275,9	1,05	0,400
Hata	414	108890,0	263,0		
Toplam	479	243471,1			

Çizelge 4.3. Birinci yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Uygulama (U)	2	26,7	13,3	0,03	0,966
Tür (T)	7	47692,4	6813,2	17,69	0,000
U x T	14	5065,6	361,8	0,94	0,517
Hata	216	83208,3	385,2		
Toplam	239	135993,0			

Çizelge 4.4. İkinci yıldaki veriler kullanılarak kallus oranları için oluşturulan varyans analiz tablosu

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Uygulama (U)	2	1176,4	588,2	2,81	0,062
Tür (T)	7	58461,7	8351,7	39,93	0,000
U x T	14	2660,2	190,0	0,91	0,550
Hata	216	45177,4	209,2		
Toplam	239	107475,8			

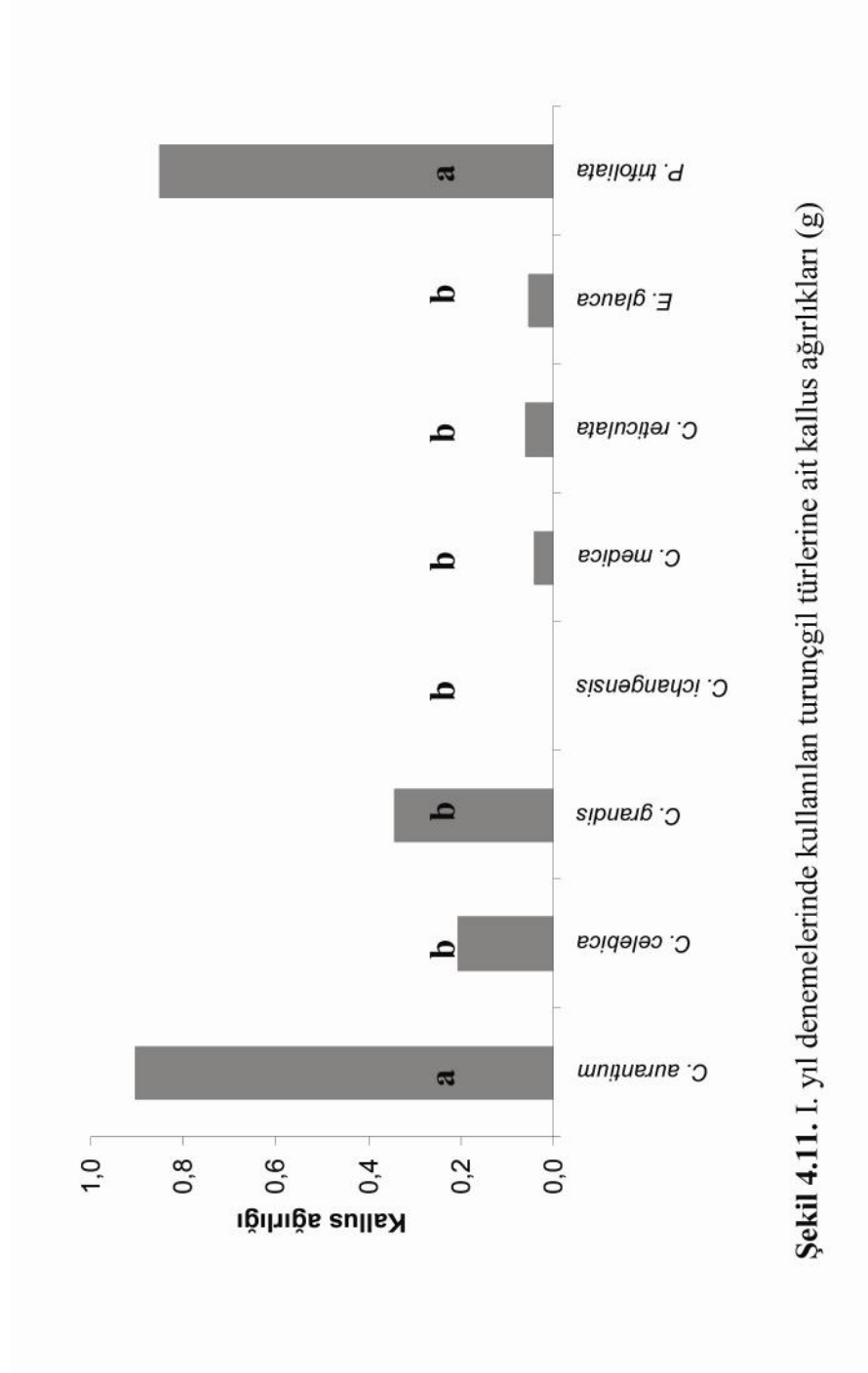
4.2. Ovüllerden Elde Edilen Kallus Ağırlık Ortalamaları

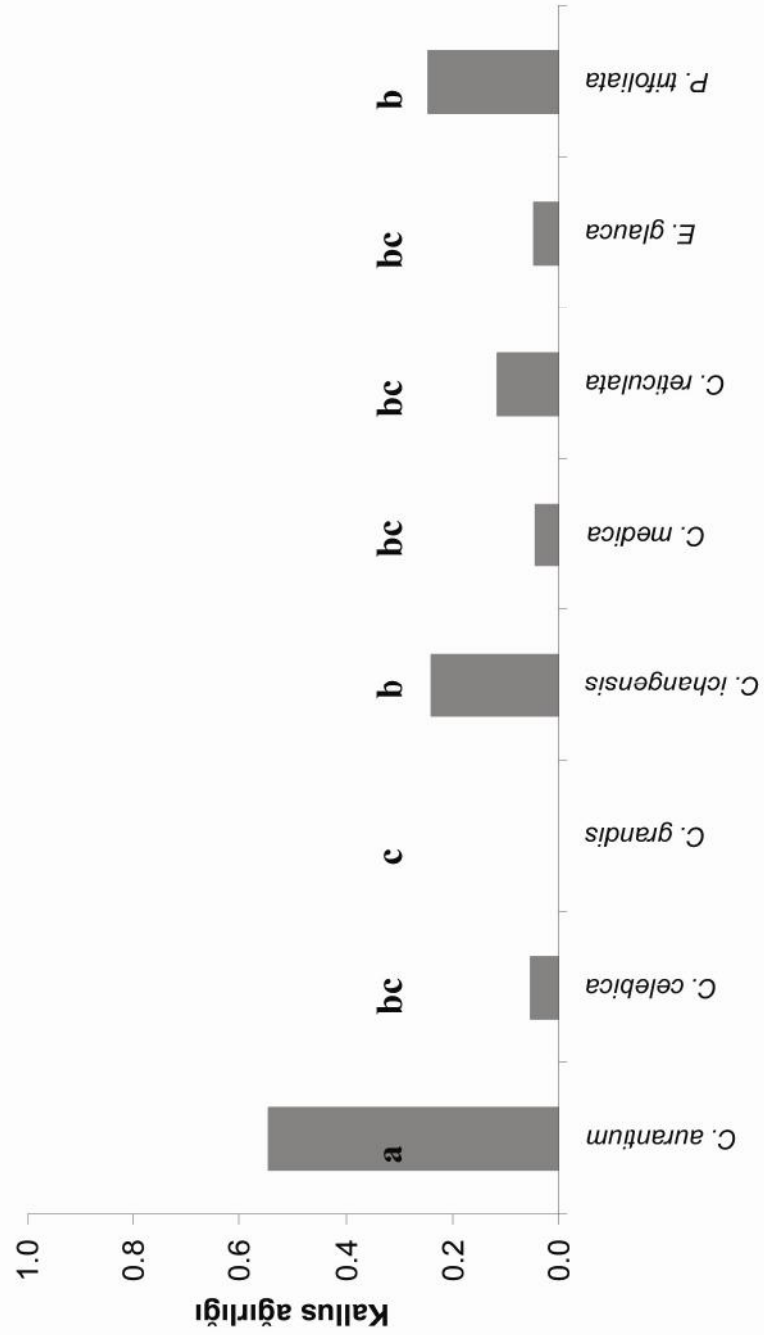
Kallus ağırlık ortalamaları hesaplanırken ovüllerden meydana gelen kallusların ortalamaları değerlendirmeye alınmıştır. Denemede yer alan genotiplerden meydana gelen kallus ağırlık ortalamaları Çizelge 4.1, 'de belirtilmiştir.

Birinci yıl denemelerinde en fazla kallus ağırlık ortalamaları kallus oluşturma oranları ile paralel olarak *C. aurantium* (0.90g) ve *P. trifoliata* (0.85g) türlerinde görülmüştür. Bu türlerin dışındaki diğer türler arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Bununla beraber elde edilen veriler sırasıyla; *C. grandis* (0.34g) ve *C. celebica* (0.24g), *E. glauca* (0.05g), *C. reticulata* (0.06g) ve *C. medica* (0.04g) türlerinden elde edilmiştir (Şekil 4.11).

II. Yıl denemelerinde kallus ağırlıkları incelendiğinde *C. aurantium* (0.55g), *P. trifoliata* (0.25g) ve *C. ichangensis* (0.24g) türlerinden en yüksek kallus ağırlıkları elde edilmiştir. I. yıl denemelerine paralel sonuçlar elde edilmesine rağmen II. yıl elde edilen sonuçlar I. yıl ortalamalarının altında bulunmuştur. En düşük kallus ağırlığı *C. medica* (0.04g) türünden elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

Turunçgil türlerinden embriyogenik kallus eldesi amacıyla kültüre alınan eksplantlerin kallus ağırlıklarına ilişkin varyans analiz tabloları her iki yıldaki veriler için Çizelge 4.5, birinci yıl verileri kullanılarak elde edilen varyans analiz tablosu Çizelge 4.6 ve ikinci yıl verileri kullanılarak elde edilen varyans analiz tablosu Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Her iki yıldaki veriler kullanılarak oluşturulan varyans analiz tablosunda genotipin tek başına ve Yıl X Tür interaksiyonun önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5). Birinci yıl ve ikinci yıl verileri ayrı ayrı dikkate alındığında yalnızca genotiplerin kallus ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak farklı olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 4.6., Çizelge 4.7).





Şekil 4.12. II. yıl denemelerinde kullanılan turunçgil türlerine ait kallus ağırlıkları (g)

Çizelge 4.5. Her iki yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Yıl (Y)	1	2,6	2,6	15,62	0,001
Tekerrür/Y	18	6,4	0,4	2,19	0,004
Uygulama (U)	2	0,9	0,5	2,89	0,057
Tür (T)	7	16,8	2,4	14,64	0,001
Y x U	2	0,3	0,1	0,9	0,408
Y x T	7	18,8	2,7	16,43	0,001
Y x U x T	28	8,3	0,3	1,81	0,008
Hata	414	67,7	0,2		
Toplam	479	121,8			

Çizelge 4.6. Birinci yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Uygulama (U)	2	0,1	0,1	0,11	0,893
Tür (T)	7	28,7	4,1	9,36	0,000
U x T	14	6,1	0,4	1,81	0,038
Hata	216	52,3	0,2		
Toplam	239	87,3			

Çizelge 4.7. İkinci yıldaki veriler kullanılarak kallus ağırlıkları için oluşturulan varyans analiz tablosu.

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Uygulama (U)	2	1,1	0,6	3,69	0,052
Tür (T)	7	6,8	1,0	6,33	0,002
U x T	14	2,2	0,2	1,52	0,104
Hata	216	21,9	0,1		
Toplam	239	32,0			

Kayım ve Koç (2006) farklı turunçgil türlerinde yaptıkları çalışmada embriyogenik kallus elde etmek için 2.26 µM 2-4,D ve % 5 sakkaroz içeren MT (Murrashige ve Tucker, 1962) ortamını kullanmışlardır. Sürekli alt kültürlerle Klemantin mandarininde % 4 laktoz kullanımıyla 700 mg kallus ağırlığı ve Washington Navel portakal çeşidinde 500 mg kallus ağırlığını elde etmişler. Kütdiken limon çeşidinde en iyi kallus ağırlığını % 4-5 laktoz uygulamasından Zagarabianca limon çeşidinde ise 220 mg kallus ağırlığını % 5 laktoz uygulamasından elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada benzer şekilde en iyi kallus ağırlığı 900 mg ile *C. aurantium* genotipinden elde edilmiştir. Klemantin mandarininde ise elde etmiş olduğumuz değer I. Yıl için 60 mg iken ikinci yıl için 50 mg olmuştur. Araştırmacıların bulguları ile aradaki farkın kullanılan karbonhidrat kaynağı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda klemantin mandarin çeşidi için embriyogenik kallus oluşumunda sakkaroz yerine laktoz kullanımı önerilebilir.

4.3. Elde Edilen Kalluslardan Muhafaza Sonrası Sürgün ve Bitkicik Elde Etme Oranları

Birinci deneme yılı sonunda elde edilen kalluslar muhafaza amacıyla 10°C’de ve karanlık koşullarda tutulmuştur. 30, 60, 90 gün sonunda kalluslardan örnekler alınarak sürgün ve bitkicik elde etme oranları saptanmıştır. 30 gün muhafaza sonunda *E. glauca*’den (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17) 5 sürgün elde edilmiş ve bu sürgünlerin 3 tanesi köklendirilebilmiştir.

P. trifoliata’dan (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20) ise 8 sürgün elde edilirken bunların 6 tanesi köklenmiştir. Buna göre köklenme oranları *E. glauca* için % 60, *P. trifoliata* için % 75 bulunmuştur. 60 gün sonunda *E. glauca*’dan 21 sürgün elde edilmiş ve bunların % 90.5’i köklendirilmiştir (19 bitkicik). *P. trifoliata*’dan ise elde edilen 6 sürgünün 6’sı köklenmiştir. 90 gün sonunda *E. glauca*’dan alınan örneklerden 10 sürgün oluşmuş ve 10’u köklendirilmiştir. *P. trifoliata*’dan ise 12 sürgün elde edilmiş ve bunların % 91.7’si (11 bitkicik) köklenmiştir. 2. deneme yılı sonunda elde edilen kalluslar muhafaza amacıyla 10°C’de ve karanlık koşullarda

tutulmuştur. 30, 60, 90 gün sonunda kalluslardan örnekler alınarak sürgün elde etme oranları saptanmıştır. Sırasıyla 30/60/90 günlük kalluslardan *C. ichangensis* (Şekil 4.21-c) için 1/0/2 sürgün, *E. glauca* (Şekil 4.21-b) için 25/27/9 sürgün, *P. trifoliata* (Şekil 4.21-d) için 3/3/0 sürgün ve *C. reticulata* (Şekil 4.21-a) için 3/1/0 sürgün elde edilmiştir.



Şekil 4.13. *E. glauca* 'nın kalluslarından meydana gelen bitkicikler



Şekil 4.14. *E. glauca* 'nın kalluslarından meydana gelen sürgünler.



Şekil 4.15. *E. glauca* 'nın kalluslarından meydana gelen sürgünler



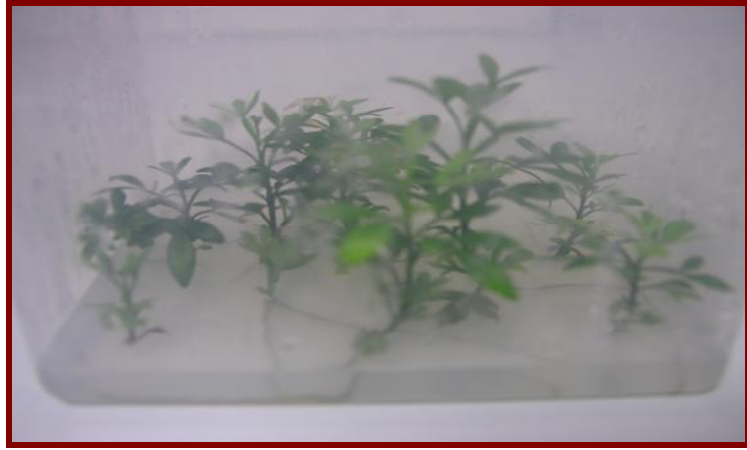
Şekil 4.16. *E. glauca* 'nın köklendirilmiş bitkicikleri



Şekil 4.17. *P. trifoliata* 'nın ovüllerinden meydana gelmiş kallus üzerinde sürgün oluşumu



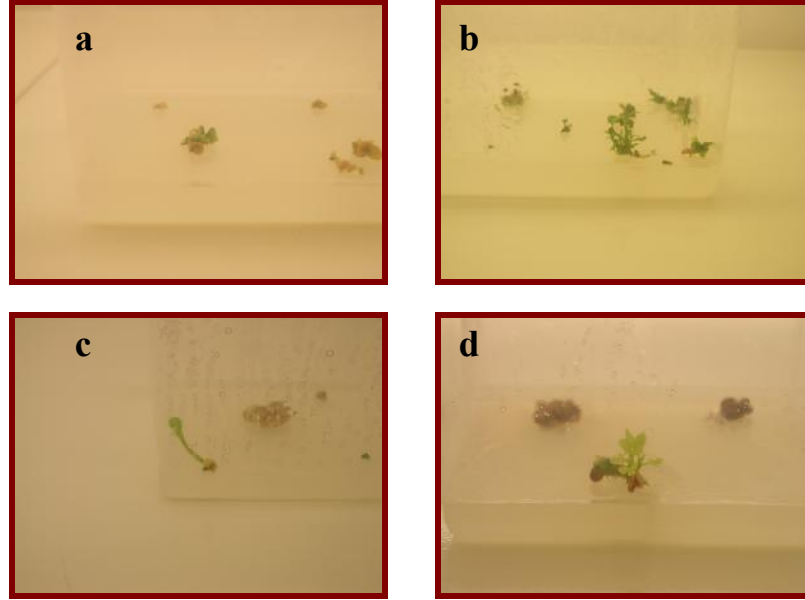
Şekil 4.18. *P. trifoliata*'nın kalluslarından bitkicik oluşumu



Şekil 4.19. *P. trifoliata*'nın kalluslarından oluşan sürgünlerin köklendirilmesi



Şekil 4.20. *P. trifoliata*'dan elde edilen bitkicikler.



Şekil 4.21. *C. reticulata* (a), *E. glauca* (b), *C. ichangensis* (c), *P. trifoliata* (d)'tan elde edilen sürgünler.

4.4. Oluşan Sürgünlerin Kök Uzunluğu Ve Kök Sayıları

Muhafaza sonrasında *E. glauca* ve *P. trifoliata*'nın 30 günlük kalluslarından elde edilen bitkiciklerde kök uzunluğu ve kök sayısına bakıldığında (Çizelge 4.8) *E. glauca* için en uzun kök 18 cm iken *P. trifoliata*'da 22 olarak belirlenmiştir. Kök uzunluğu ortalamalarına bakıldığında *E. glauca* için 8.6 cm *P. trifoliata* için 10.1 cm bulunmuştur. Kök sayıları ise *E. glauca* için en yüksek değer 5, ortalama 1.8, *P. trifoliata* için en yüksek değer 3, ortalama 1.25 olarak saptanmıştır. 60 günlük *E. glauca* kalluslarından elde edilen en yüksek kök uzunluğu 43 cm, ortalama ise 19.9 cm, *P. trifoliata* için en yüksek kök uzunluğu 28 cm, ortalama ise 19.7 cm olarak saptanmıştır. Kök sayılarına bakıldığında *E. glauca* için en yüksek 3, ortalama 1.09, *P. trifoliata* için en yüksek 4, ortalama 2.5 olarak saptanmıştır. 90 günlük kalluslardan elde edilen bitkilerde kök uzunluğu ve kök sayılarına bakıldığında kök uzunluğu *E. glauca* için en yüksek 60 cm, ortalama 27.8 cm, *P. trifoliata* için en yüksek 10 cm, ortalama 5.7 cm bulunmuştur. Kök sayıları ise *E. glauca* için en

yüksek 2, ortalama 1.6, *P. trifoliata* için en yüksek 5, ortalama 1.7 olarak saptanmıştır. II. denemede köklendirilme yapılmamıştır. I. yıl denemeleri sonucunda *E. glauca*'nın çöl bitkisi olması nedeniyle çok uzun köklü bitkicikler oluşturduğu sanılmaktadır.

Çizelge 4.8. I. Deneme yılı sonunda genotiplerden kallus yaşlarına göre elde edilen köklenme oranları, kök uzunluğu ve kök sayıları.

Genotip		Köklenme (%)		Kök uzunluğu (cm)			Kök sayısı (adet)		
		Oran	%	Max.	Ort.	Min.	Max.	Ort.	Min.
<i>E. glauca</i>	30gün	3/5	60	18	8.6	11.5	5	1.8	2
	60 gün	19/21	90.5	43	19.9	6	3	1.09	1
	90 gün	10/10	100	60	27.8	15	2	1.6	1
<i>P. trifoliata</i>	30 gün	6/8	75	22	10.1	9	3	1.25	1
	60 gün	6/6	100	28	19.7	5	4	2.5	1
	90 gün	11/12	91.7	10	5.7	3	5	1.7	1

Çizelge 4.9. II. Deneme yılı sonunda genotiplerden kallus yaşlarına göre elde edilen sürgün sayıları.

Genotipler	Kallus yaşları		
	30 gün	60 gün	90 gün
<i>C. ichangensis</i>	1	0	2
<i>E. glauca</i>	25	27	9
<i>P. trifoliata</i>	3	3	0
<i>C. reticulata</i>	3	1	0

4.5. Oluşan Bitkiciklerden Örneklerin Alınması, DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi ve DNA miktarlarının saptanması.

Ovül izolasyonunda kullanılacak olan meyvelerin toplanması sırasında ana bitkilerden genç yaprak örnekleride alınmıştır. *In vitro* örnekler ise kallus kültürü sonunda muhafazaya alınan örneklerden 30, 60, 90 gün sonunda sürgün geliştirme ortamına alınan ve köklendirilen bitkiciklerin yapraklarından alınmıştır. İkinci deneme yılında köklendirilme yapılmamış kaynak olarak direk sürgünler kullanılmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan genotiplerin, alınma dönemleri, kallus yaşları, uygulama ve elde edilen DNA miktarları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

4.6. RAPD Analizleri

Çalışmanın RAPD analizlerinde turunçgillerde polimorfik olduğu bilinen toplam 21 primer kullanılmıştır [OPAA 07, OPAA17, OPAC 05, OPAC 06, OPAC 11, OPAC 16, OPAF 04, OPAF 06, OPAF 12, OPAK 04, OPE 01, OPE 02, OPE 05, OPE 09, OPE 13, OPE 19, OPU 02, OPU 17, OPB 04, OPB 13, OPB 18 (**Deng ve ark., 2000; Kaçar ve ark., 2005; Bastianel ve ark., 2006**). 6 primer istenilen amplifikasyonu vermediği için değerlendirilmeye alınamamıştır.

Deng ve ark. (1998) turunçgillerde polimorfik olarak bulduğu **OPE 05** primeri tüm genotipler için belirgin bir band (1250 bp) vermesine rağmen beklenen amplifikasyonu vermediği için değerlendirilmeye alınmamıştır. Ayrıca **Kaçar ve ark. (2005)** limonlarda polimorfik olarak bulduğu **OPU 02** tüm genotipler için 2 belirgin band (450, 900 bp) vermesine rağmen beklenen amplifikasyonu vermediği için değerlendirilmeye alınamamıştır. Çalışmamızda değerlendirilmeye alınan toplam 13 primerden toplam 33 band elde edilmiştir. En yüksek band sayısı **OPAK 04** primerinden 12 band olarak bulunurken, en düşük band sayısı **OPAF 04** primerinden elde edilmiştir (3 band). Ortalama band sayısı ise 2.54 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. DNA izolasyonunda kullanılan örneklerin genotipleri, alınma dönemleri, kallus yaşları, uygulama ve elde edilen DNA miktarları

Genotip	Örnek Alma Dönemi	Örnek Sırası	Kallus Yaşı (gün)	<i>In vitro</i> uygulama	DNA miktarı (ng/μl)
<i>E. glauca</i>	<i>In vivo</i> 2005	1	Kontrol	--	23.00
	2005	2	30	--	21.43
		3	60	--	16.50
		4	90	--	22.14
	2006	5	30	Kontrol	14.71
		6	30	0.5 BAP	8.87
		7	30	1 BAP	10.24
		8	60	Kontrol	14.95
		9	60	0.5 BAP	11.06
		10	60	1 BAP	30.05
		11	90	Kontrol	14.12
		12	90	0.5 BAP	14.37
		13	90	1 BAP	28.95
<i>P.trifoliata</i>	<i>In vivo</i> 2005	14	Kontrol	--	20.94
	2005	15	30	--	19.31
		16	60	--	19.77
		17	90	--	19.51
	2006	18	30	Kontrol	11.71
		19	30	1 BAP	7.88
		20	60	Kontrol	13.12
<i>C. ichangensis</i>	<i>In vivo</i> 2005	21	Kontrol	--	15.60
	2006	22	30	Kontrol	13.73
		23	90	1 BAP	9.65
<i>C. reticulata</i>	<i>In vivo</i> 2005	24	Kontrol	--	9.79
	2006	25	30	0.5 BAP	6.68
		26	60	0.5 BAP	10.39

Tez kapsamında elde edilen bitkiciklerin genetik kararlılıklarını saptamak amacıyla yapılan DNA analizlerinde kullanılan **OPE 09** primerinden toplam 6 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 3 monomorfik band (520, 1100, 1700 bp), *P. trifoliata* için 3 monomorfik band (500, 650, 750 bp), *C. ichangensis* için 3 monomorfik band

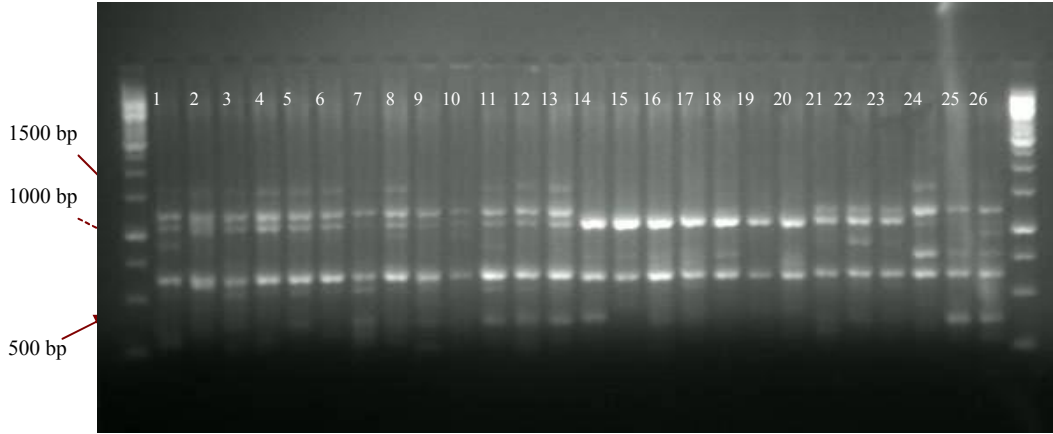
(900, 1100, 1700 bp) ve *C. reticulata* için 2 monomorfik band (1100, 1700 bp) elde edilmiştir.

OPB 18 RAPD primerinden toplam 9 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 5 monomorfik band (400, 500, 900, 1100, 1350 bp), *P.trifoliata* için 4 monomorfik band (375, 450, 850, 1050 bp), *C. ichangensis* için 4 monomorfik band (375, 450, 900, 1050 bp) ve *C. reticulata* için 4 monomorfik band (375, 450, 900, 1050 bp) elde edilmiştir.

OPAA 07 primerinden toplam 5 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 1 monomorfik band (1100 bp), *P. trifoliata* için 2 monomorfik band (525, 975 bp), *C. ichangensis* için 2 monomorfik band (875, 975 bp) ve *C. reticulata* için 2 monomorfik band (600, 975 bp) elde edilmiştir.

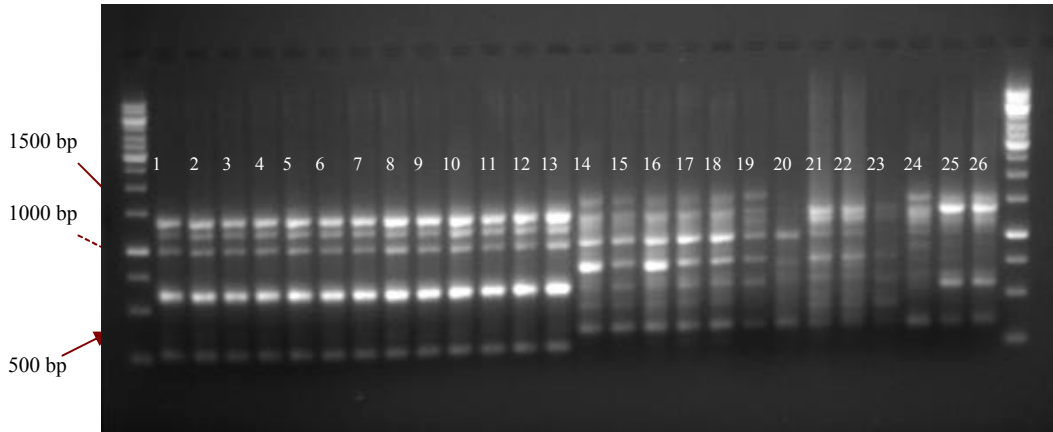
OPAA 17 primerinden toplam 9 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 5 monomorfik band (480, 875, 1000, 1100, 1400 bp), *P. trifoliata* için 3 monomorfik band (480, 700, 800 bp), *C. ichangensis* için 2 monomorfik band (500, 1000 bp) ve *C. reticulata* için 4 monomorfik band (500, 1000, 1200, 1400 bp) elde edilmiştir.

OPAC 06 primerinden toplam 8 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 3 monomorfik band (625, 1100, 1250 bp), *P.trifoliata* için 2 monomorfik band (600, 1050 bp), *C. ichangensis* için 3 monomorfik band (625, 1100, 1200 bp) ve *C. reticulata* için 4 monomorfik band (375, 625, 815, 1250 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.22).



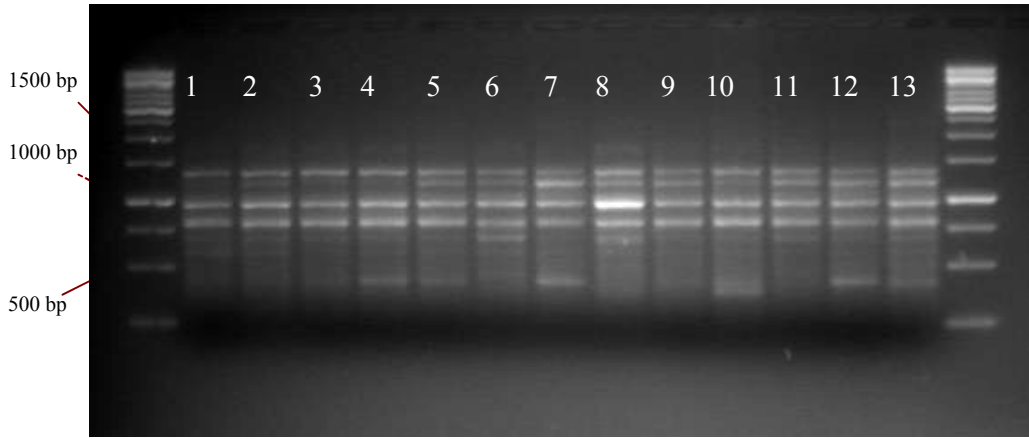
Şekil 4.22. OPAC 06 primeri ile turunçgil ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAK 04 primerinden toplam 12 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 5 monomorfik band (270, 600, 950, 1250, 1400 bp), *P. trifoliata* için 6 monomorfik band (350, 600, 750, 1000, 1400, 1500 bp), *C. ichangensis* için 3 monomorfik band (750, 1000, 1300 bp) ve *C. reticulata* için 4 monomorfik band (375, 650, 1400, 1500 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.23).

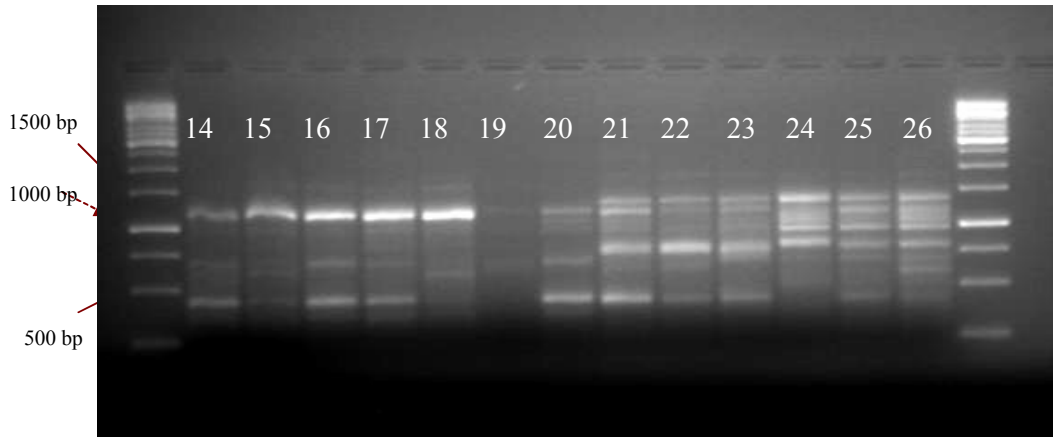


Şekil 4.23. OPAK 04 primeri ile turunçgil ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAC 11 primerinden toplam 10 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 5 monomorfik band (400, 800, 975, 1200, 1300 bp), *P.trifoliata* için 3 monomorfik band (400, 700, 1200 bp), *C. ichangensis* için 4 monomorfik band (400, 750, 1200, 1300 bp) ve *C. reticulata* için 4 monomorfik band (1000, 1100, 1200, 1350 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

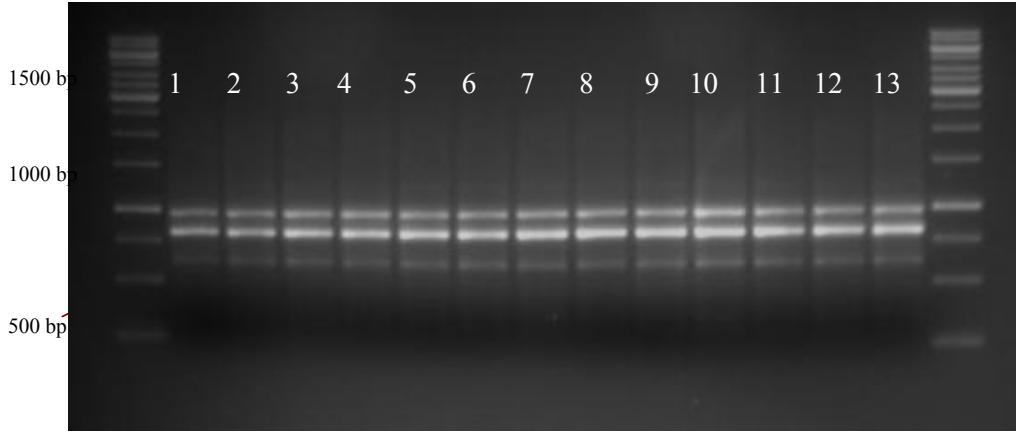


Şekil 4.24. OPAC 11 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

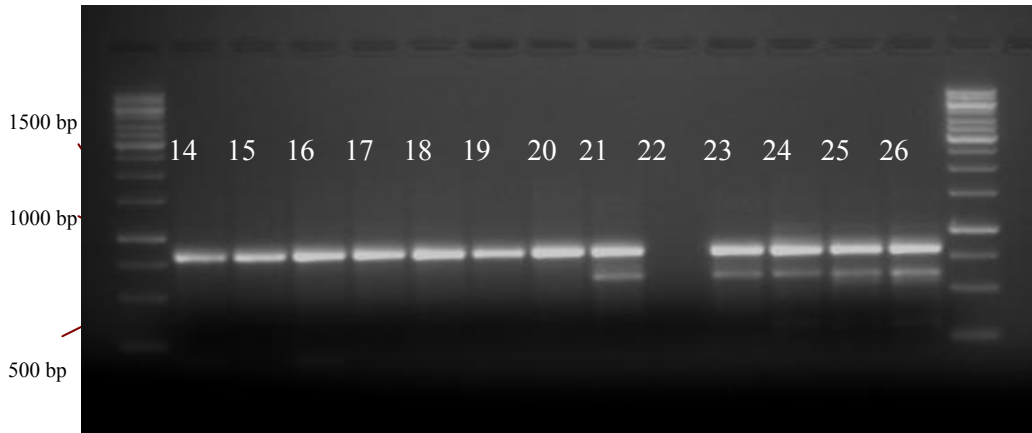


Şekil 4.25. OPAC 11 primeri ile *P.trifoliata*, *C. reticulata*, *C. ichangensis* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAF 04 primerinden toplam 3 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 3 monomorfik band (675, 800, 950 bp), *P.trifoliata* için 1 monomorfik band (800 bp), *C. ichangensis* için 2 monomorfik band (675, 800 bp) ve *C. reticulata* için 2 monomorfik band (675, 800 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27).

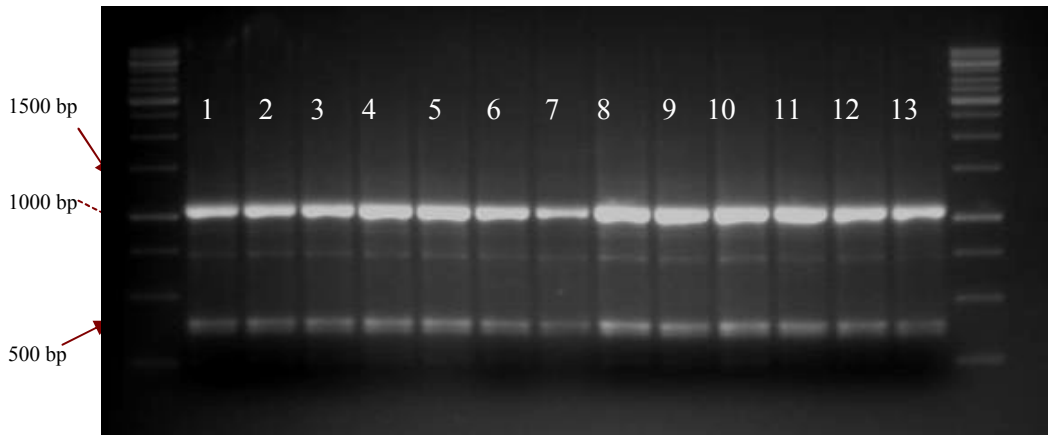


Şekil 4.26 OPAF 04 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

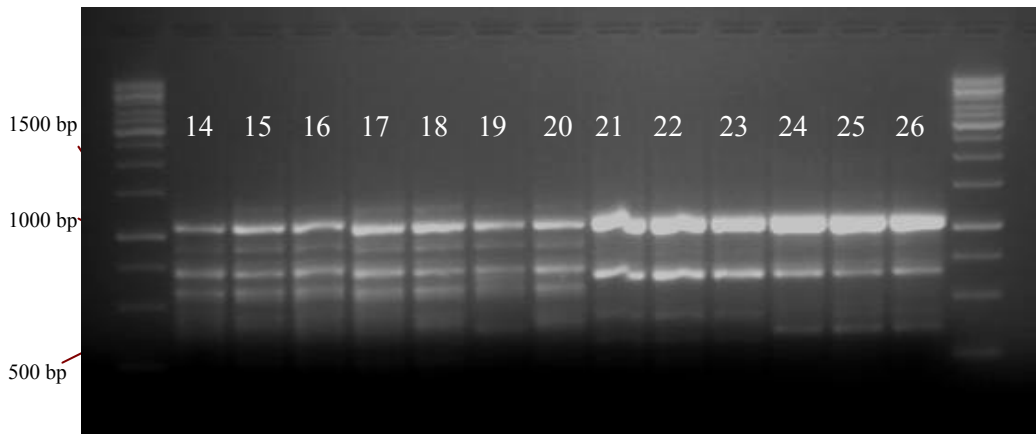


Şekil 4.27. OPAF 04 primeri ile *P. trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAF 06 primerinden toplam 5 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 3 monomorfik band (400, 700, 1050 bp), *P. trifoliata* için 4 monomorfik band (600, 700, 950, 1050 bp), *C. ichangensis* için 2 monomorfik band (700, 1050 bp) ve *C. reticulata* için 2 monomorfik band (700, 1050 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.28, Şekil 4.29).

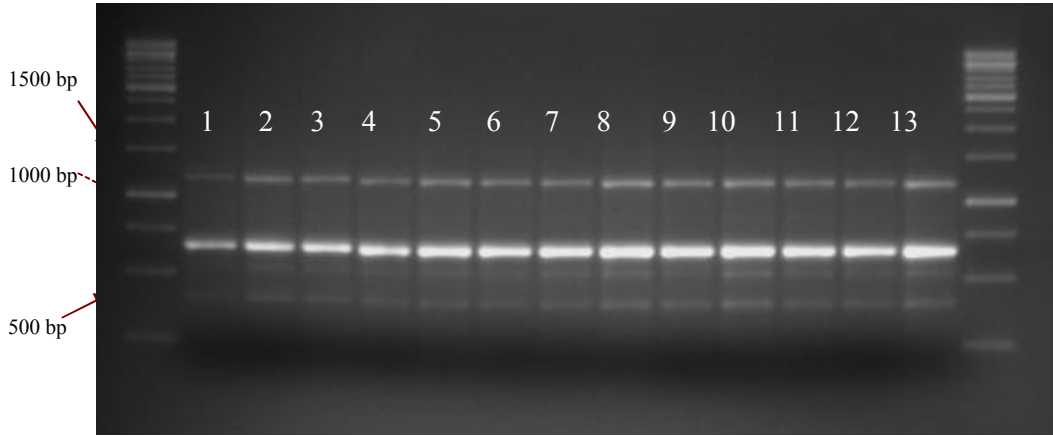


Şekil 4.28. OPAF 06 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

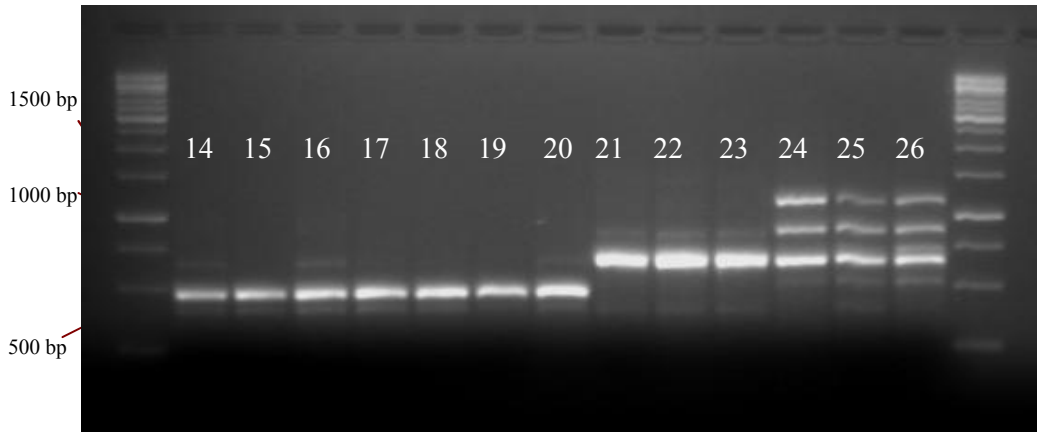


Şekil 4.29. OPAF 06 primeri ile *P. trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAF 12 primerinden toplam 6 band elde edilmiştir. *Eremocitrus glauca*'da 3 monomorfik band (400, 650, 1200 bp), *P. trifoliata* için 1 monomorfik band (490 bp), *C. ichangensis* için 1 monomorfik band (700 bp) ve *C. reticulata* için 3 monomorfik band (700, 850, 1200 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.30, Şekil 4.31).

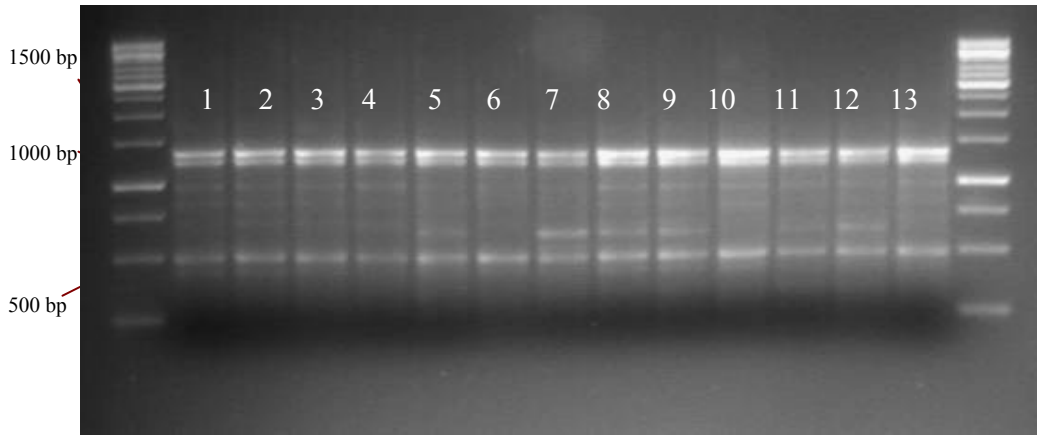


Şekil 4.30. OPAF 12 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

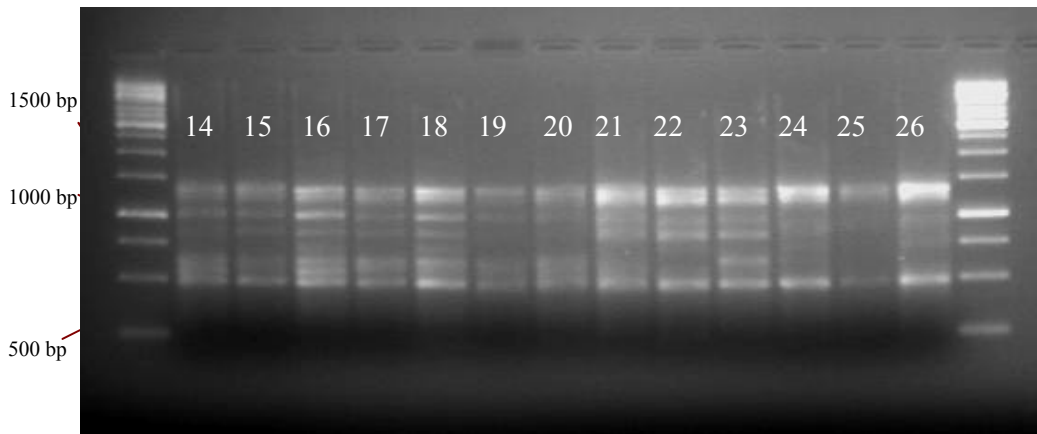


Şekil 4.31. OPAF 12 primeri ile *P. trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPE 02 primerinden toplam 7 band elde edilmiştir. *Eremocitrus glauca*'da 4 monomorfik band (400, 675, 1300, 1350 bp), *P.trifoliata* için 6 monomorfik band (500, 600, 675, 800, 1000, 1350 bp), *C. ichangensis* için 5 monomorfik band (500, 675, 800, 1000, 1350 bp) ve *C. reticulata* için 2 monomorfik band (500, 1350 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33).

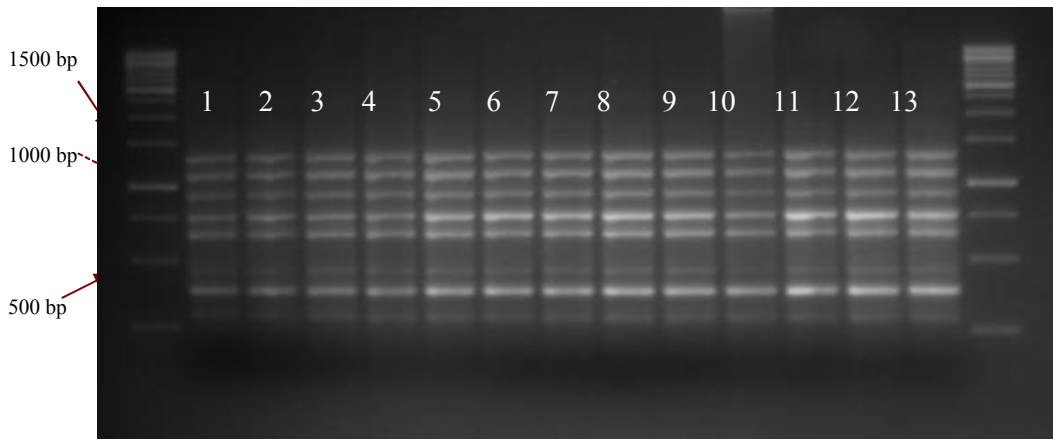


Şekil 4.32. OPE 02 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

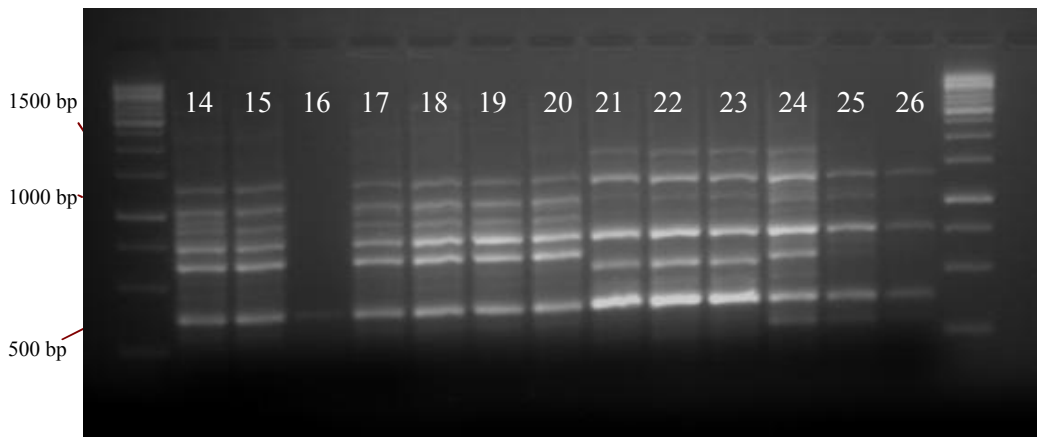


Şekil 4.33. OPE 02 primeri ile *P. trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPE 19 primerinden toplam 12 band elde edilmiştir. *Eremocitrus glauca*'da 7 monomorfik band (300, 350, 650, 750, 900, 1100, 1350 bp), *P. trifoliata* için 6 monomorfik band (375, 675, 750, 875, 1100, 1300 bp), *C. ichangensis* için 5 monomorfik band (400, 600, 750, 1300, 1700 bp) ve *C. reticulata* için 3 monomorfik band (400, 750, 1300 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.34, Şekil 4.35).

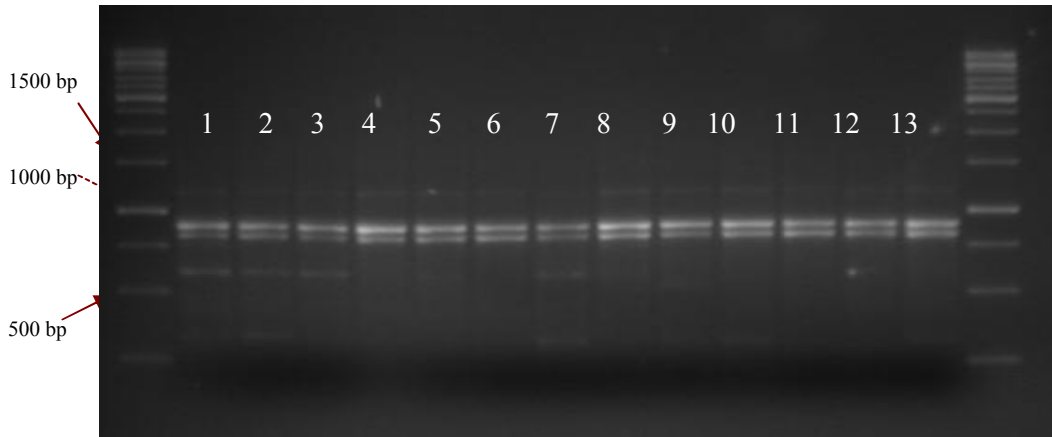


Şekil 4.34. OPE 19 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

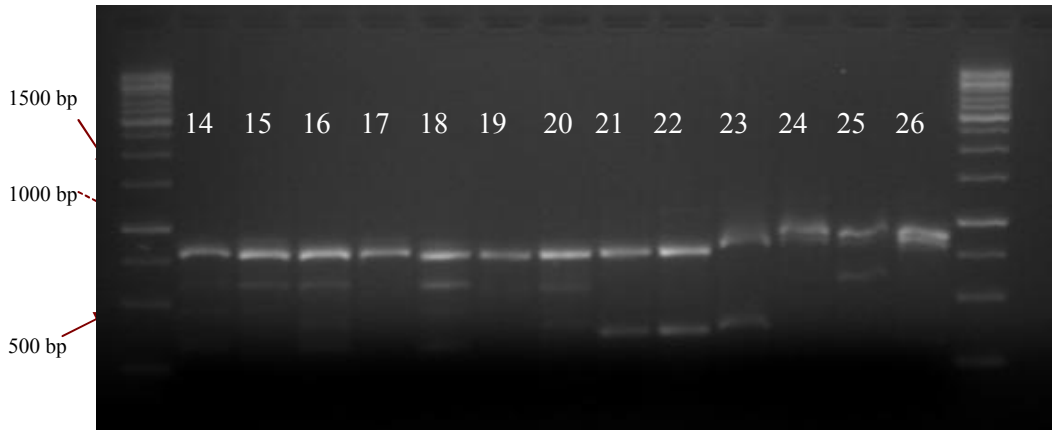


Şekil 4.35. OPE 19 primeri ile *P.trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

OPAC 05 primerinden toplam 4 band elde edilmiştir. *E. glauca*'da 2 monomorfik band (800, 850 bp), *P. trifoliata* için 2 monomorfik band (600, 800 bp), *C. ichangensis* için 2 monomorfik band (300, 800 bp) ve *C. reticulata* için 1 monomorfik band (800 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.36, Şekil 4.37).



Şekil 4.36. OPAC 05 primeri ile *E. glauca* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri



Şekil 4.37. OPAC 05 primeri ile *P. trifoliata*, *C. ichangensis*, *C. reticulata* ana bitki ve kallus hatlarının amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri

Tez kapsamında kullanılan bitkisel materyal ve RAPD primerleri ile orijinal bitkiler ile *in vitro* koşullarda muhafaza edilmiş bitkiler arasında DNA düzeyinde herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. DNA analizleri ile ilgili elde etmiş olduğumuz bulgular **Hao ve ark. (2004)** Red marsh altıntopunda yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri bulgularla uyumlu bulunmuştur. Yine aynı şekilde **Hou (1999)** bir yıl sonunda muhafazada bulunan kalluslarda RAPD analizleri gerçekleştirilmiş, kontrolde olduğu gibi hiçbir varyasyona rastlamamıştır. Araştırmacı, çalışma sonunda RAPD yönteminin genetik yapılarının ortaya konulmasında yeterli bir yöntem olduğu fakat epigenetik değişikliklerin belirlenmesinde DNA metilasyonunun en iyi model olduğu bildirilmiştir.

Ramkrishna ve Singh (2005) *C. reticulata* Blanco, *C. jamphiri* Lush'a ait kotiledon segmentlerinden bitki regenerasyonu ve muhafazası konusunda çalışmalar yapmışlardır. MS + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA içeren ortamda adventif embyolar elde etmişler. Elde ettikleri bitkiler ve ana bitkide RAPD analizlerini gerçekleştirmişler. 5 RAPD primeri kullanmışlar ve elde edilen regenerantların ismine doğru olduklarını ortaya koymuşlar. Yaptıkları çalışmanın genetik kaynakların değişiminde, ileride yapılabilecek transformasyon çalışmalarında, *in vitro* genetik kaynak muhafazası gibi çalışmalara yararlı olacağını vurgulamışlardır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada on farklı turuncğil genotipinden elde edilen ovuler kallusların azaltılmış büyüme koşullarında (1/2 MS, 10°C sıcaklık ve karanlık) muhafazası ve farklı muhafaza sürelerinde (90, 120, 150 günlük) bu kalluslardan sürgün ve bitkicik elde etme olanakları araştırılmıştır. *In vitro* muhafaza sonrasında elde edilen sürgün ve bitkiciklerde moleküler analizler (**RAPD**) gerçekleştirilerek *in vitro* koşullarda muhafaza sırasında genetik yapılarında bir değişim olup olmadığı belirlenmiştir.

Denemede yer alan genotiplerden *Microcitrus australasica* ve *Fortunella margarita* türlerinde istenilen kalitede embriyogenik kalluslar elde edilememiştir. Her iki yılda da söz konusu türlerinden embriyogenik kallus elde edilememesinin nedeni bu türlerin kullanılan eksplante (ovul) ya da kültüre alındığı besi ortamına tepki vermemesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu türler için bundan sonra yapılacak denemelerde stil, stigma veya olgunlaşmamış tohum gibi farklı eksplantların, farklı büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kültüre alınması önerilebilir.

Denemede kullanılan turuncğil türlerine ait kallus oluşum oranları değerlendirildiğinde; I yıl denemelerinde, en fazla kallus oluşum oranı *C. aurantium* (5.2) ve *P. trifoliata* (4.0) türlerinde olmuştur. En düşük kallus oluşturma oranı 0.9 ile *C. medica*’ da gerçekleşirken, *C. ichangensis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir. II. Yıl denemelerinde kallus oluşturma oranları incelendiğinde, *C. ichangensis* ve *C. grandis* türleri dışında I yıl denemelerine paralel sonuçlar elde edildiği gözlenmektedir. II. yıl denemelerinde I. yıl denemelerinde olduğu gibi en yüksek kallus oluşturma oranı *C. aurantium* (5.2) türünden elde edilmiş bunu 4.0 kallus oluşturma oranı ile *P. trifoliata* (4.0) izlemiştir. En düşük kallus oluşturma oranı I. yıl denemelerindeki gibi 0.5 ile *C. medica*’da gerçekleşmiştir. *C. grandis* türünden kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Kallus oluşum oranları ile ilgili olarak elde edilen verilerin literatür bulgularından düşük olmasının sebebi embriyogenik kallus elde etmek amacıyla kullanılan ovüllerin integumentlerinin uzaklaştırılmadan kültüre alınmış olması olabilir. Araştırmacılar ovul integumentlerinin uzaklaştırılarak nucellus ile besi ortamının temasının sağlanmasının embriyogenik kallus eldesinde önemli olduğunu

vurgulamaktadırlar. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında 4 aylık meyvelerin ovüllerini kullanırken araştırmamızda 2 aylık meyveler kullanılmıştır (Carimi ve ark. 1998).

Denemede yer alan genotiplerden elde edilen kallusların ağırlıkları değerlendirildiğinde birinci yıl denemelerinde en fazla kallus ağırlık ortalamaları *C. aurantium* (0.90g) ve *P. trifoliata* (0.85g) türlerinde görülmüştür. Bu türlerin dışındaki diğer türler arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. II. Yıl denemelerinde kallus ağırlıkları incelendiğinde *C. aurantium* (0.55g), *P. trifoliata* (0.25g) ve *C. ichangensis* (0.24g) türlerinden en yüksek kallus ağırlıkları elde edilmiştir. I. yıl denemelerine paralel sonuçlar elde edilmesine rağmen II. yıl elde edilen sonuçlar I. yıl ortalamalarının altında bulunmuştur. *C. reticulata* gibi bazı genotiplerde elde edilen kallusların ağırlık ortalamalarının oldukça düşük olması bu genotipler için farklı karbarbonhidrat kaynaklarının kullanılabileceğini akla getirebilir. Nitekim araştırmacılar turunçgillerde embriyogenik kallus elde etme ve bu kallusların gelişmesinde karbonhidratların çok önemli olduğunu ve özellikle sukroz yerine laktoz ve galaktoz kullanımının kallus gelişimini attırdığını bildirmişlerdir Kayım ve Koç (2006).

Ovüler ekplantlerden embriyogenik kallus eldesinde elde edilen verilerle gerçekleştirilen varyans analizlerinde, kültür ortamında kullanılan farklı BA konsantrasyonlarının istatistiksel olarak kallus oluşumuna ve kallus ağırlığına etkisi saptanmamıştır. Bu durum özellikle *in vitro* muhafaza açısından çok önemlidir. Çünkü kültür ortamında kullanılan büyümeyi düzenleyici maddeler kültürde varyasyona neden olarak genetik birtakım değişiklikler meydana getirebilmektedirler.

Araştırmada kültüre alınan ovüllerden yaklaşık olarak 60 gün sonunda meydana gelen kalluslar azaltılmış koşullarda muhafazaya alınmıştır. Oluşan kalluslar birbirlerinden farklılıklar göstermiştir (kırılgan, kompakt vb.). Kompakt olmayan kalluslar azaltılmış koşullardan etkilenmiş ve hızlı bir şekilde kararak canlılıklarını yitirdikleri görülmüştür. Fakat bazı genotiplere ait (*P. trifoliata*) kararmış kalluslar normal şartlarda kültüre alındığında ($27^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 8 saat karanlık 16 saat aydınlık, Full MS) sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Muhafaza sonrasında kalluslardan alınan örneklerin bir kısmı parçalanarak büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında kültüre alınırken bir kısımda BAP içeren ortamda parçalanmadan kültüre alınmıştır. MS ortamına alınan örneklerden önce kök daha sonra sürgün oluşturarak tam bir bitkicik meydana getirirken, BAP içeren ortamda sürgünler meydana gelmiştir. Bu sürgünler daha sonra NAA içeren ortamda köklendirilmiştir.

Kalluslardan sürgün ve bitkicik oluşum oranları incelendiğinde I. deneme yılında yalnızca *E. glauca* ve *P.trifoliata* türlerine ait kalluslarından sürgün ve bitkicikler elde edilmiştir. Diğer genotiplerden sürgün ve bitkicik oluşumu gözlenmemiştir. II. deneme yılında ise *E. glauca* ve *P. trifoliata*'nın yanı sıra *C. reticulata* ve *Citrus ichangensis*'e ait kalluslardan da sürgünler elde edilebilmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, sürgün ve bitkicik elde etme oranı en iyi bulunan *E. glauca*'nın kallus oluşum oranı ve kallus ağırlıklarına bakıldığında oranların oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sürgün ve bitkicik elde edilebilen diğer genotip olan *P. trifoliata*'nın kallus oluşum oranı ve ağırlık ortalamalarının yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısı ile sürgün ve bitkicik elde edilmesinin kallus oluşum oranlarına veya kallus ağırlık ortalamasına bağlı olmadığı söylenebilir.

Ayrıca örneklerin alınmasıyla ilgili önceki çalışmalarda belirtilen kriterler portakal, mandarin ve limon gibi embriyogenik kallus ve somatik embriyo elde etmede sıklıkla kullanılan türler için kullanılabileceği söylenebilir. Kabuk kalınlığının meyve içine oranı fazla ve ovül gelişimi yavaş olan *C. aurantium*, *C. ichangensis*, *Poncirus trifoliata* gibi genotiplerde tam çiçeklenmeden 2-8 hafta sonra olarak belirtilen sürenin daha uzun bir periyoda yayıldığı (10-12 hafta) gözlenmiştir.

Özellikle tez çalışması kapsamında istenilen nitelikte embriyogenik kallus elde edilemeyen genotipler için bu denemede kullanılan büyüme düzenleyicilerle birlikte yada farklı kombinasyonlar içeren ortamlar ve farklı karbonhidrat kaynakları denenmesi önerilebilir. Araştırmacılar, embriyogenik kallus elde edebilmek için tek kültürün yeterli olmadığını sürekli altkültürler yapılması gerektiği belirtmişlerdir.

Dolayısıyla başlangıç kültüründen sonra direk muhafazaya alma yerine, elde edilen kallusların sürekli altkültürlerinin yapılması (yaklaşık 5-6 alt kültür)

embryogenik kallus elde edilebilmesi için yararlı olacaktır. Embriyonik kallus elde edilmesi için ise ovülün yanı sıra farklı materyaller (tohum, epikotil, kotiledon, kök, stil, stigma vb.) kullanılmalıdır. Kalluslardan sürgün oluşumu için kullanılan ortam içeriğinin (BAP-GA₃) farklı oranları denenmeli, kültür koşulları (ışıklandırma periyodu ve farklı sıcaklık dereceleri) değiştirilmeli ve kültürde bekleme süresi ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır.

In vitro koşullarda muhafaza edilmiş embriyogenik kalluslardan elde edilen bitkilerde DNA düzeyinde herhangi bir varyasyon gözlenmemiştir. Bu bitkiciklerin genetik kararlılıklarının saptanması amacıyla araştırmamızda kullanılan RAPD yöntemi bu güne kadar benzeri çalışmada başarı ile kullanılmış özellikle ucuz, hızlı, kolay ve pratik olması nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerden biri olmuştur. Bununla birlikte kullanılan her markır sistemi genomun farklı bölgelerini taradığı düşünülecek olursa ve kullanılan markır sistemleri her zaman genomun morfolojik karakterlerini kodlayan bölgeleri amplifiye etmediği için farklı markır sistemleri kullanılması ve mümkün olduğunca o türe özgü polimorfizm gözlenmiş olan primerlerin kullanımı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

ANONİM 2002 <http://www.fao.org>

ANONİM 2002a http://www.tuba.gov.tr/files_tr/yayinlar/yayin_data/genetik kaynaklaralani.doc

ANONİM 2003 Ülkesel genetik kaynaklar araştırma ve geliştirme projesi, Toplantı raporu, Haziran, Ankara

ANONİM 2004. Global Agriculture Information Network

ANONİM 2005 <http://www.ortohum.gov.tr/Tekbul/biotek.doc>

ANONİM 2005a <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/014sezensehirali.pdf>

ANONİM 2006 <http://www.faostat.org>

ASHBURNER, G.R., FAURE, M.G., D.R. TOMILSON., 1996. Collection of Coconut (*Cocos nucifera*) Embryos from Remote Locations. Seed sci. Technol. 24:159-171.

ASHMORE, S., DREW, R., 2003. Update on the Development of Advanced Technologies for Germplasm Conservation of Tropical Fruit Species: An ACIAR Funded Project. In Mai, B., Ramamani, Y.S., Rao, V.R. (ed) Conservation and Use of Native Tropical Fruit Species Biodiversity in Asia pp 23-27. Proceeding of the Third Annual Meeting of Tropical Fruit Genetic Resources Project, Chongqing, China 25-28 March

AVENIDO, R.A., ENDONELA, L.E., PATEÑA, L.F., BARBA, R.C., 2005. Developing Plant Regeneration Systems for in Vitro Conservation of Mandarin (*Citrus reticulata*) and Pummelo (*Citrus maxima*). ISHS Acta Horticulturae 694: International Symposium on Harnessing the Potential of Horticulture in the Asian-Pacific Region

BASTIANEL, M., OLIVEIRA, A. C. DE, CRISTOFANI, M., 2006 Genetic Diversity Among hybRids of Sweet Orange and 'Murcott' Tangor Evaluated by faFLP and RAPD Markers. *Pesq. agropec. bras.* vol. 41, no. 5, pp. 779-784.

- BEGUM, F., AMIN, M.N., ISLAM, S., AZAD, M.A.K., 2004. A comparative Study of Axillary Shoot Proliferation from the Nodal Explants of Three Varieties Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.). Biotechnology, 3 (1):56-62
- CALOVIC, M., VILORIA, Z., NIELSEN, B., GMITTER, F.G., JR, CASTLE, W.S., AND GROSSER, J.W., 2000. Somatic Embryogenesis from Lemon Style and Analysis of Genetic Stability in Regenerated Plants Using RAPD and Flow Cytometry. Global Citrus Germplasm Network Meeting, December
- CARIMI, F., TORTORICI, M.C., DE PASQUALE, F., CRESCIMANNO, F.G., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture Volume 54, Number 3 (1998) ; 183-189
- CARIMI, F., DE PASQUALE, F., CRESCIMANNO, F. G., 1999. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Pistil Thin Cell Layers of Citrus. Plant Cell Reports Volume 18, Number 11 (1999);935-940
- CHAKRAVARTY, B., GOSWAMI, B.C., 1999. Plantlet Regeneration from Long-Term Callus Cultures of *Citrus acida* Roxb. and the Uniformity of Regenerated Plants. Scientia Horticulture 82 (1999) 159-169
- CHATURVERDI, H.C., SHARMA, M., 1987. excised root culture-a novel method for germplasm preservation. In: Reddy, G.M., (Ed) Plant Cell and Tissue Culture of Economically Important Plants. Osmania University, Hyderabad. Pp. 175-179
- CHO, E.G., HOR, Y.L., KIM H.H., RAO, V.R., ENGELMANN, F., 2001. Cryopreservation of *Citrus madurensis* Zygotic Embryonic Axes by Vitrification: Importance of Pregrowth and Precultured Conditions. Cryoletters 22 (6) : 391-396
- CHO, E.G., HOR, Y.L., KIM H.H., RAO, V.R., ENGELMANN, F., 2002. Cryopreservation of *Citrus madurensis* Embryonic Axes by Encapsulation-Dehydration. Cryoletters 23 (5) : 325-332

- DENG, X. X., G. B. LIU AND ZHANG, W. C., 1985. Study on the Chromosome Variation of Citrus Callus. *J. Chin. Citrus* 3:4-7
- DENG, X. X., HU, C. G., HUO, H. GUO, W.W. and H. Yİ. 2000. A Preliminary Study of Citrus Germplasm Conservation and its Evaluation by RAPD Analysis. *Proc. I. Int. Sym. on Citrus Biotechnology* Eds. R. Goren and E.E. Goldshmidt. *Acta Hort.* 535 pp 99-105.
- DIXIT, S., MANDAL, B.B., AHUJA, S., SRIVASTAVA, P.S., 2003. Genetic Stability of Plants Regenerated from Cryopreserved Embryogenic Tissue of *Dioscorea bulbifera* L. Using RAPD, Biochemical and Morphological Analysis. *Cryoletters* 24 (2): 77-84 MAR-APR.
- DULLOO, M.E., GUARINO, L., ENGELMANN, F., MAXTED, N., NEWBURY, J.H., ATTERE, F., FORD-LLOYD, B. V., 1998. Complementary Conservation Strategies for the Genus *Coffea*: A Case Study of Mascarene *Coffea* Species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45/6 (1998) : 565-579
- EMEKLİER, H.Y. 2001. Germplasm Muhafazası. *Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları)* Ed. M.Babaoğlu, E.Gürel, S.Özcan. 282-323.
- ERNER, Y., REUVENI, O., GOLDSCHMIDT, E.E., 1975. Partial Purification of a Growth Factor from Orange Juice Which Affects Citrus Tissue Culture and Its Replacement by Citric Acid. *Plant Physiol.* (1975) 56, 279-282
- EVANS, D.A. and SHARP, W. R. 1983. Single Gene Mutations in Tomato Plants Regenerated from Tissue Culture. *Science* 221: 949-951.
- IORE, S., DE PASQUALE, F., CARIMI, F., SAJEVA, M., 2002. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on Somatic Embryogenesis from Stigma and Style Transverse Thin Cell Layer of Citrus. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cul.* 68/1 : 57-63.
- FRISON, E.A. and PUTTER, C.A.J. 1988. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of germplasm. in *Abstr. 5. Int. Cong. Plant Pathol., Kyoto, Int. Soc. For Plant Pathol.* P.279.
- GERMANA, M.A., WANG, Y.Y., BARBAGALLO, M.G., IANNOLINO, G., CRESCIMANNO, F.G., 1994. Recovery of Haploid and Diploid Plantlets

- from Anther Culture of *Citrus clementina* Hort and *Citrus reticulata* Blanco. J. Hortic. Sci. 69, 473-480
- GMITTER, F.G. JR. AND MOORE, G.A., 1986. Plant Regeneration from Undeveloped Ovules and Embryogenic Calli of Citrus: Embryo Production, Germination and Plant Survival. Plant Cell Tissue Org. Cult. 6: 139-147.
- GROSER, J.W., GMITTER, F.G. JR. AND CHNADLER, J.L., 1997. Somaclonal Variation in Sweet Orange – a Tool for Cultivar Improvement. 8.Int. Citrus Congress., Sun City, South Africa, 1996. Proc. Int. Soc. Citriculture 1:203-206
- HAO, Y.J., YOU, C.X., DENG, X.X., 2002. effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. Cryoletters 23 (1) : 27-35.
- HAO, Y.J., WEN, X.P., DENG, X.X., 2004 Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. J. Plant Physiol. 161. 479-484
- KABAYASHI, S., IKEDA, I., NAKATANI, M., 1984. Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and uniformity of regenerated plants. Bull. Fruit Tree Res. St., Jpn. 5, 43-54
- KAÇAR, Y.A., DEMİREL, A., TUZCU, Ö., YEŞİLOĞLU, T., ULAŞ, M., YILDIRIM, B. 2005. Preliminary Results on Fingerprinting Lemon Genotypes Tolerant to Mal Secco (*Phoma tracheipfila*) Disease by RAPD Markers. Biologia, Bratislava 60 (3): 295-300.
- KENCE, A., 2005. Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri (giriş)
- KOCHBA, J., SPIEGEL-ROY, P., SAAD, S., NEUMAN, H., 1978. Effect of Galactose and Galactose Containing Sugars on Embryogenesis in Citrus Callus. ISHS Acta Horticulturae 78: Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes
- KÜDEN, A.B. 2001. Genetic Resources of Temperate Zone Fruits in Turkey. Proc. 6th IS Temp. Fruit Trop. & Subtrop. Acta Hort. 565: 33-35.
- LAMBARDI, M., DE CARLO, A., BIRICOLTI, S., PUGLIA, A.M., LOMBARDO, G., SIRAGUSA, M., DE PASQUALE, F. 2004. Zygotic

- and Nucellar Survival Following Dehydration/Cryopreservation of Citrus Intact Seeds. *Cryoletters* 25 (2) : 81-90
- LING, J-T., IWAMASA, M., 1997. Plant Regeneration from Embryogenic Calli of Six *Citrus* Related Genera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 145-148
- MARIN, M.L. AND N. DURAN-VILA, 1982. Cryopreservation of Somatic Embryos of 'Washington Navel' Sweet Orange. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 313-317
- MARIN, M.L. AND N. DURAN-VILA, 1992. Cryopreservation of Somatic Embryos of "Washington Navel" Sweet Orange. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 313-317
- MENDES-DA-GLORIA, F.J., FILHO, F.A.A.M., DEMETRIO, C.G.B., MENDES, B.M.J., 1999. Embryogenic Calli Induction from Nucellar Tissue of Citrus Cultivars. *Scientia Agricola*, v.56, n.4, p.1111-1115
- MILLER, J.C. AND TANKSLEY, S.D. 1990. RFLP Analysis of Phylogenetic Relationships and Genetic Variation in the Genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.*, 80 (4): 437-448.
- MURASHIGE, T. AND F. SKOOG, 1962. A Revised medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- NG, S.Y.C. AND NG, N.Q., 1991. Reduced Growth Storage of Germplasm. In: JH Dodds (ed), *In vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources, P.247, Chapman and Hall, The University Press, Cambridge
- ONGHIA, A.M.D., DJELOUAH, K., 2000. Somatic Embryogenesis from Style Culture: A New Technique for the Sanitation Conservation, and Safe Exchange of Citrus Germplasm. Global Citrus Germplasm Network Meeting, December.
- ÖZGEN M., ADAK M. S., SÖYLEMEZOĞLU G., ULUKAN H., 2000. Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma Ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar: Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi.
- PATENA, L.F., ENDONELA, L.E., REFUERZO, L.C., BARBA, R.C., 2005. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Calamansi (×

- Citrofortunella microcarpa* Bunge.) ISHS Acta Horticulturae 694: International Symposium on Harnessing the Potential of Horticulture in the Asian-Pacific Region
- PEREZ, R. M., MAS, O., NAVARRO, L., DURAN, V. N., 1999. Production and Cryopreservation of Embryogenic Cultures of Mandarin and Mandarin Hybrides. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 71-74.
- RAO, K.N., 2004. Plant Genetic Resources: Advancing Conservation and Use Through Biotechnolog. African J. Of Biotechnology, Vol.3(2), pp 136-145.
- RAMKRISHNA, K. N., and SANJAY, K. S., 2005. In Vitro Adventitive Embryony in Citrus: A Technique for Citrus Germplasm Exchange. Current Science, vol. 88, no. 8, 25
- RICCI, A.P., FILHO, F.A.A.M., MENDES, B.M.J., PIEDADE, S.M.S., 2002. Somatic Embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. Scientia Agricola, v.59, n.1, p.41-46
- ROUT, G.R., DAS, P., GOEL, S., RAINA, S.N., 1998. Determination of Genetic Stability of Micropropagated Plants of Ginger Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Bot. Bull. Acad. Sin. (1998) 39:23-27
- SAS Institute Inc., 1990: Sas User Guide; SAS/STAT, Version 6. SAS Inst. Inc., Cary, N.C.
- SINGH, A., NITO, N., IWAMASA, M., 1992. Influence of Lactose and Glycerol on Growth and Somatic Embryogenesis of Citrus Callus. ISHS Acta Horticulturae 321: Frontier in Tropical Fruit Research
- TAHIR, K.M., 2003. Beyond conservation: the role of TFNET in sustainable utilization of native tropical fruit species. In Mai, B., Ramamani, Y.S., Rao, V.R. (ed) Conservation and Use of Native Tropical Fruit Species Biodiversity in Asia pp 21-22. Proceeding of the Third Annual Meeting of Tropical Fruit Genetic Resources Project, Chongqing, China 25-28 March
- TUZCU, Ö., ÇINAR, A., KAPLANKIRAN, M., YEŞİLOĞLU, T., 1986. Bazı Önemli Turunçgil Anaçları ile Turunçgillerin Akraba Cins, Tür, ve Çeşitlerinin İlkbahar Gelişme Döneminde *Phytophthora citrophthora*

- (Smith and Smith) Leonian'a Dayanıklılıkları. TÜBİTAK Bitki Islahı Simpozyumu Bildiri Özetleri. s : 20. TÜBİTAK Yayın No : 629, TOAG Seri No : 12, s : 20. TÜBİTAK Matbaası. Ankara
- TUZCU, Ö., 2000. Report of the Mediterranean Citrus Network-MECINET and Some Suggestions for the Future. Global Citrus Germplasm Network Meeting. December.
- TUZCU, Ö., 2002. Turunçgiler Ders Notları (yayınlanmamış)
- WANG, Q., BATUMAN, O., BAR-JOSEPH, M., GAFNY, R., 2000. Cryopreservation of *In vitro* 'Troyer' Citrange Shoot Tips. Global Citrus Germplasm Network Meeting, December
- WANG, Z.C., LI, P., BATUMAN, O., GAFNY, R., MAVAMASSI, M., 2003. Effect of Benzyladenine of Cryopreserved Shoot Tip of Grapevine and Citrus Cultured *In Vitro*. Cryoletters 24 (5): 293-302.
- WANG, Z.C., DENG, X.X., 2004. Cryopreservation of Shoot Tip of Citrus Using Vitrification: Effect of Reduced Form of Glutathione. Cryoletters 25 (1): 43-50.
- WITHERS, L.A., 1994. New technologies for the conservation of plant genetic resources. In Proc. of the Int. Crop Sci. Cong. Ames, USA. Crop Sci. Soc. of America, 429-435.
- WITHERS, L.A. AND F. ENGELMANN, 1997. *In vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. In. Altman A.(ed) Biotechnology in Agriculture. Marcel Dekker Inc. New York, pp 57-88.
- ZHAI, Z.Y., Y.J., WU, F. ENGELMANN, R.Z. CHEN, Y.H. ZHAO, 2003. Genetic Stability Assesments of Plantlets Regenerated from Cryopreserved *in vitro* Cultured Grape and Kiwi Shoot Tips Using RAPD. Cryoletters 24 (5): 315-322 .

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Yüreğirde'de tamamladım. Ç.Ü Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl yüksek lisans öğrenimime başladım. Şu anda Toros Tarım'da çalışmaktayım.