



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYÇİÇEĞİ BİTKİSİNDE (*Helianthus annuus* L.) BİTKİ REGENERASYONU
OPTİMİZASYONU**

Melek BAYRAKTAROĞLU

Prof. Dr. Nazan DAĞÜSTÜ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA-2012

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI



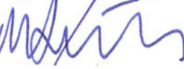
Melek BAYRAKTAROĞLU tarafından hazırlanan “AYÇİÇEĞİ BİTKİSİNDE (*Helianthus annuus* L.) BİTKİ REGENERASYONU OPTİMİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçoğluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr. Nazan DAĞÜSTÜ

Başkan: Prof.Dr. Nazan DAĞÜSTÜ

Üye: Doç.Dr. Ümran ERTÜRK

Üye: Doç.Dr. Mehmet SİNCİK

İmza: 
İmza: 
İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr. Kadri ARSLAN

Enstitü Müdürü

28/05/2012

U.Ü. Fen bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

28/05/2012

Melek BAYRAKTAROĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AYÇİÇEĞİ BİTKİSİNDE (*Helianthus annuus* L.) BİTKİ REGENERASYONU OPTİMİZASYONU

Melek BAYRAKTAROĞLU

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DAĞÜSTÜ

Bu araştırmada ayçiçeği bitkisinde (*Helianthus annuus* L) klonal çoğaltım, sentetik tohum üretimi, gen aktarımı ve generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitkilerin üretimini kolaylaştırmak için somatik embriyogenesis ve organogenesis aracılığıyla regenerasyon protokolü oluşturmak amaçlanmıştır. Araştırmada, *in vitro* yüzey sterilizasyonu optimizasyonu ve ayçiçeğinde regenerasyonda etkili olan bazı faktörler üzerinde çalışılmıştır.

Olgun tohumlarda yüzey sterilizasyonunu tohum kabuklarını soyarak yapma bulaşma oranını azaltırken çimlenme oranını arttırmıştır. En uygun tohum çimlendirme süresi 3 gün olmuştur. Karanlık koşullarda çimlendirme ve embriyo indüksiyon ortamında bırakma bitki regenerasyonunu pozitif yönde etkilemiştir. Uygun genotip ve eksplant seçimi regenerasyonda kesinlikle önemli rol oynamaktadır. Eksplant kaynağı genotipe bağlı olarak sürgün ve kök regenerasyonu üzerinde farklı etki göstermiştir. İki ticari hibrid ayçiçeği çeşidinden Pactol genellikle daha iyi kallus ve bitkicik regenerasyonu gösterirken, Sirena ise kök ve sürgün oluşturma potansiyeli açısından en iyi sonuçları vermiştir. Eksplant yaşının artması kallus oluşturma oranını arttırmış olmasına rağmen, regenerasyon üzerinde olumsuz etkiye sahip olmuştur. En iyi bitkicik regenerasyonu % 0.1 BA/0.1 NAA ve % 0.1 BA/1.5 NAA hormon uygulamalarından elde edilmiştir. Bitki regenerasyonu değerleri açısından en uygun embriyo indüksiyon ortamı modifiye White olmuştur. Ters zedeli olarak embriyo indüksiyon ortamına (EIO) bırakılan kotiledonlar çok sayıda kallus ve kök üretirken besi ortamına düz ve herhangi bir zedeleme uygulanmadan bırakılan kotiledon eksplantlarında ise daha iyi sürgün oluşmuştur.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre hem kotiledon hem de hipokotil eksplant kaynaklarından kallus, embriyo benzeri yapı, kök, sürgün ve bitkicik oluşumu elde edilmiştir. *In vitro* şartlarda elde edilen bitkicikler dış koşullara alıştırmak için toprağa aktarılmışlardır. Saksılarda yetiştirilen bitkilerde tabla ve çiçek üretimi olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, somatik embriyogenesis, organogenesis, regenerasyon, regenerasyonda etkili olan faktörler

2012, ix +83 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

OPTIMIZATION OF PLANT REGENERATION IN SUNFLOWER

(Helianthus annuus L.)

Melek BAYRAKTAROĞLU

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DAGUSTU

In this research, the regeneration protocol in sunflower (*Helianthus annuus L*) via either somatic embryos or organogenesis has been developed for use at clonal propagation, synthetic seed production, gene transformation and production of plants which cannot be developed via sexual reproduction. The optimization of *in vitro* seed sterilization methods and some factors affecting the plant regeneration in sunflower have been studied in this research.

Surface sterilization was done after seed coat removed at mature seeds increased the germination capacity and decreased the contamination rates. The best the age of seedling was 3 days. Dark conditions at germination and embryo induction medium affect the plant regeneration positively. Selection of genotype and explant has a definite role in regeneration. Explant type affect differently shoot and root regeneration depended on the genotype. Within two commercial hybrids, Pactol produced more callus and developed plantlet while Sirena had high root and shoot production. Although increase of seedling age resulted in statistically the higher amount of callus per explant, the morphogenic capacity chanced depended on the genotype. The best plantlet regeneration was obtained from % 0.1 BA/0.1 NAA and % 0.1 BA/1.5 NAA hormone applications. Modified White basal medium at embryo germination stage was most suitable for plant regeneration. The wounding of the cotyledons with the scalpel left upside down in embryo induction medium (EIM) produced high amount of callus and root formation while cotyledons without wounding left upsite into medium had high shoot formation.

Based on the results from the present study, a callus, embryo like structures, root and shoot regenerations from both hypocotyls and cotyledon explants were obtained. A number of regenerated plantlets developed *in vitro* conditions were transferred to soil and kept in the greenhouse for acclimatization and produced head and flower in the pots.

Key Words: Sunflower, somatic embryogenesis, organogenesis, regeneration, factors affecting regeneration

2012, ix+ 83 pages.

TEŞEKKÜR

Bana bu yüksek lisans çalışmasını veren, titizlikle yöneten, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DAĞÜSTÜ'ne, varyans analizlerinin yapılmasında ve yorumlanmasında yardımcı olan hocam Prof. Dr. Abdurrahim Tanju GÖKSOY'a, tezimin arazi aşamasında destek ve yardımlarını gördüğüm hocam Doç. Dr. Mehmet Sincik'e çalışmalarında her türlü imkan ve yardımlarını esirgemeyen bölüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Hem laboratuvar aşamasında hem de tez yazım aşamasında bana destek ve yardımcı olan hocam Dr. Gamze BAYRAM'a, laboratuvar aşamasında yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Ziraat Mühendisi Şerife BALCI'ya, Ziraat Mühendisi Sezin Muslu'ya ve Ziraat Mühendisi Şule ŞAHİN'e , üniversite personellerimizden Sevginar ALADAĞ, Semra GÜR, Mergül KULAKSIZOĞLU, Filiz AKGÜN'e teşekkürlerimi bir vefa borcu olarak görmekteyim.

Bu tezi hazırlamamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Sema BAYRAKTAROĞLU'na, rahmetli babam Ali Rıza BAYRAKTAROĞLU'na, abim Yücel BAYRAKTAROĞLU'na, yengem Esra BAYRAKTAROĞLU'na ve teyzem Mürvet URUNLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bu çalışmada bana yardımcı olan ve adlarını burada tek tek belirtmediğim, emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Melek BAYRAKTAROĞLU
28/05/2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Bitki Materyali	17
3.2. Deneme Yeri ve Özellikleri	17
3.3. Arazi Koşullarında Yapılan Ekim ve Bakım İşlemleri.....	18
3.4. Kendilenmiş Ayçiçeği Hatlarının Elde Edilmesi.....	19
3.5. <i>İn Vitro</i> Koşullarda Yapılan Çalışmalar.....	20
3.5.1. Besi ortamları.....	20
3.5.1.1. Makro ve mikro elementlerin stok solüsyonlarının hazırlanması.....	21
3.5.1.2. Jelat (Na ₂ -EDTA, FeSO ₄ .7H ₂ O) solüsyonunun hazırlanması.....	22
3.5.1.3. Vitamin stok solüsyonlarının hazırlanması.....	22
3.5.1.4. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonlarının hazırlanması.....	23
3.5.1.5. Stok solüsyonlardan yararlanılarak tohum çimlendirme besisi ortamının hazırlanması (1/2 MS).....	23
3.5.1.6. Embriyo indüksiyon ortamının hazırlanması (EİO ve EİO-A).....	25
3.5.1.7. Modifiye White besisi ortamının hazırlanması (MWO).....	25
3.5.1.8. Anderson besisi ortamının hazırlanması (ABO).....	27
3.5.1.9. Odunsu bitki besisi ortamının hazırlanması (OBO).....	27
3.5.1.10. Gamborg besisi ortamının hazırlanması (B5).....	27
3.5.1.11. Sürgün geliştirme besisi ortamının hazırlanması (VM).....	27
3.5.1.12. Köklendirme besisi ortamının hazırlanması (RA2).....	27
3.5.1.13. Embriyo çimlendirme besisi ortamının hazırlanması (GM).....	27
3.5.2. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve ayçiçeği eksplantlarının besisi ortamına bırakılması.....	28
3.5.3. Kültüre alma koşulları (İnkübasyon).....	30
3.5.4. Embriyo indüksiyon ortamında gelişen kallusların embriyo çimlendirme ortamına aktarılması.....	31
3.5.5. Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen sürgünlerin sürgün geliştirme besisi ortamlarına aktarılması.....	31
3.5.6. Gelişen sürgünlerin kök geliştirme ortamlarına aktarılması.....	32
3.5.7. Bitkiciklerin dış ortama aktarılması (Aklimatizasyon).....	32
3.5.8. Bitkilerin toprağa şaşırtılması.....	33
3.5.9. <i>İn vitro</i> koşullarda yürütülen gözlem ve ölçümler.....	34
3.5.10. Verilerin değerlendirilmesi.....	38
3.5.10.1. Ayçiçeği bitkisinde <i>in vitro</i> sterilizasyon optimizasyonu.....	38
3.5.10.1.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği genotiplerinde <i>in vitro</i> sterilizasyon optimizasyonu.....	39

3.5.10.1.2. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği genotiplerinde <i>in vitro</i> sterilizasyon optimizasyonu.....	39
3.5.10.2. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve embriyo indüksiyon ortamında kalma süresinin <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi.....	39
3.5.10.3. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, gözlem zamanı ve olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi.....	39
3.5.10.4. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve NAA/BA konsantrasyonlarının <i>in vitro</i> regenerasyon üzerine etkisi.....	40
3.5.10.5. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve çimlendirme sürelerinin <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi.....	40
3.5.10.6. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşullarının <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi.....	41
3.5.10.7. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şeklinin <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi...	42
3.5.10.8. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının <i>in vitro</i> regenerasyon değerleri üzerine etkisi.....	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	44
4.1. Ayçiçeği Bitkisinde <i>İn Vitro</i> Sterilizasyon Optimizasyonu.....	44
4.1.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği genotiplerinde <i>in vitro</i> sterilizasyon optimizasyonu.....	44
4.1.2. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği genotiplerinde <i>in vitro</i> sterilizasyon optimizasyonu.....	47
4.2. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Embriyo İndüksiyon Ortamında Kalma Süresinin <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi.....	53
4.3. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Gözlem Zamanı ve Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi.....	57
4.4. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve NAA/BA Konsantrasyonlarının <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Üzerine Etkisi.....	59
4.5. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Çimlendirme Sürelerinin <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi.....	64
4.6. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Aydınlanma Koşullarının <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi	67
4.7. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Kotiledon Eksplantlarına Uygulanan Mekanik Zedeleme ve Kotiledon Eksplantlarının EİO'ya Bırakılma Şeklinin <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi.....	69
4.8. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve EİO Bazal Ortamlarının <i>İn Vitro</i> Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi.....	71
5. SONUÇ	74
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No:
Şekil 3.1. Ayçiçeği genotiplerinin tohumlarını çoğaltmak amacıyla arazi koşullarında yapılan ekimler.....	19
Şekil 3.2. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerin bez torbalar ile izolasyonu ve yaprak ile yapılan kendileme çalışması.....	20
Şekil 3.3. Besi ortamlarının hazırlanması.....	28
Şekil 3.4. Ayçiçeği tohumlarının yüzey sterilizasyonu.....	29
Şekil 3.5. Ayçiçeği genotiplerinden eksplant kaynaklarının elde edilmesi....	30
Şekil 3.6. U. Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'na ait inkübasyon odası.....	31
Şekil 3.7. Ayçiçeğinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarından organogenesisle elde edilen sürgünlerden VM ve RA2 besli ortamlarında bitkicik oluşturulması.....	32
Şekil 3.8. Regenere olan ayçiçeği bitkiciklerinin dış ortama aktarılması.....	33
Şekil 3.9. Viollerde gelişen bitkilerin saksılara şaşırılarak doğal şartlarda Yetiştirilmesi.....	33
Şekil 3.10. Besi ortamlarında gözlenen bulaşma çeşitleri.....	34
Şekil 3.11. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen kotiledon eksplant kaynağında skor sistemine göre kallus oluşturma değerleri.....	35
Şekil 3.12. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen hipokotil eksplant kaynağında skor sistemine göre kallus oluşturma değerleri.....	35
Şekil 3.13. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında sürgün oluşumu.....	36
Şekil 3.14. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında kök oluşumu.....	37
Şekil 3.15. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında bitkicik oluşumu.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No:
Çizelge 3.1. Araştırmada ele alınan ayçiçeği genotiplerinin özellikleri ve temin edildiği yer.....	17
Çizelge 3.2. Bursa ilinde uzun yıllar ortalaması ile denemenin yürütüldüğü yıla ait iklim değerleri.....	18
Çizelge 3.3. Stok solüsyonlar kullanılarak 1/2 MS yapay besi ortamının Hazırlanması.....	24
Çizelge 3.4. Ayçiçeği <i>in vitro</i> regenerasyon denemelerinde kullanılan besi ortamları (mg/L).....	26
Çizelge 4.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında sterilizasyon optimizasyonu denemesi varyans analizi değerleri.....	44
Çizelge 4.2. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 3. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	45
Çizelge 4.3. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 5. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	46
Çizelge 4.4. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 7. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	47
Çizelge 4.5. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında sterilizasyon optimizasyonu denemesi varyans analizi değerleri.....	48
Çizelge 4.6. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 3. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	50
Çizelge 4.7. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 5. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	51
Çizelge 4.8. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 7. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	52
Çizelge 4.9. Genotip, eksplant ve gözlem zamanının kallus, sürgün, kök ve eby oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri.....	53
Çizelge 4.10. Ayçiçeği bitkisinde genotip, gözlem zamanı ve eksplant kaynağının kallus, sürgün, kök ve eby oluşturma oranı üzerine etkileri.....	55

Çizelge 4.11. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanının kallus, sürgün ve eby oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri.....	58
Çizelge 4.12. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanının kallus, sürgün ve eby oluşturma oranı üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.13. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanlarının kök oluşturma oranlarına ait verilerin ortalama tablosu.....	59
Çizelge 4.14. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve BA/NAA konsantrasyonlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranına ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)..	60
Çizelge 4.15. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve BA/NAA konsantrasyonlarının kallus, kök, sürgün ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	63
Çizelge 4.16. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının kallus ve kök oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	64
Çizelge 4.17. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının kallus ve kök oluşturma oranı üzerine etkileri Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	65
Çizelge 4.18. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının sürgün, embriyo benzer yapı ve bitkicik oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin ortalama tablosu (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	66
Çizelge 4.19. Ayçiçeği bitkisinde genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşulunun kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 8. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	67
Çizelge 4.20. Ayçiçeği bitkisinde genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşulunun kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 8. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	68
Çizelge 4.21. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şekillerinin kallus, sürgün ve kök oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)..	69
Çizelge 4.22. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şekillerinin kallus, sürgün ve kök oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	70

Çizelge 4.23. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır).....	71
Çizelge 4.24. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri.....	72

1. GİRİŞ

Asteraceae familyasının önemli bir üyesi olan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), Türkiye ve dünyada yetiştirilen önemli yağ bitkilerinden birisidir (Robinson 1981). FAO kaynaklarına göre 2010 yılında, ülkemizde ekimi yapılan yağ bitkileri arasında ayçiçeği 641.343 hektar ekim alanı ve 1.320.000 ton üretimle 206 kg/da verime sahip olurken, dünyada yağ bitkileri arasında 23.104.402 hektar ekim alanı ve 30.558.635 ton üretimle 132 kg/da verime sahip olmuştur (Anonim 2010a). Ülkemizde, 2000'li yıllar boyunca ayçiçeği bitkisinden elde edilen verim artışına paralel olarak, ekim alanı ve üretimde de bir artış görülmesine rağmen, Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre son 10 yılda yaklaşık 195.245 ton ayçiçek yağı ithal edilmiştir (Anonim 2010b).

Ayçiçeği tarımının geniş çapta arttırılabilmesi için birçok agronomik ve kalite özellikleri bakımından genetik yapının iyileştirilmesi gerekmektedir. Günümüze değin yapılan klasik ıslah çalışmaları, yüksek yağ oranı, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin elde edilmesi gibi önemli agronomik ve fizyolojik karakterler üzerinde yoğunlaşmıştır (Seiler ve Rieseberg 1997).

Genetik tabanın dar olması ayçiçeği ıslahında, istenen özelliklere sahip hatların seçimi ve üretilmesinde sorun teşkil etmektedir. Klasik ıslah metotlarıyla yabani türlerdeki genlerin, kültürü yapılan türlere aktarımı için gerekli olan türler arası melezlemelerin de başarı oranının düşük veya hiç olmaması, ayçiçeği ıslahında kültür çeşitlerinde, genetik çeşitlilik tabanını arttırmak amacı ile yeni biyoteknolojik ıslah yöntemlerine (somatik embriyogenesis, somaklonal varyasyon, embriyo kurtarma tekniği, organogenesis, meristem kültürü, anter ve polen kültürleri, protoplast kültürü vb. *in vitro* doku kültürleri ve çeşitli gen transferi yöntemleri) başvurmayı gerekli kılmaktadır (Bidney ve Scelonge 1997, Babaoğlu ve ark. 2004, Kaya 2004).

Ayçiçeği ıslah çalışmalarında *in vitro* yöntemler ile seleksiyon ve gen transformasyon tekniklerinin birlikte başarılı olarak uygulanabilmesi için ayçiçeğinde optimize edilmiş bir regenerasyon sistemine ihtiyaç vardır.

Uygun koşulların sağlanması halinde, tek bir canlı hücrenin tüm bitkiyi oluşturabilecek genetik bilgi ve regenerasyon kapasitesine sahip olması olarak bilinen hücrelerin totipotensi özelliğinden yararlanılarak protoplast, hücre, doku ve organlarının kültürüne alınmasıyla *in vitro* bitki regenerasyonu gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2012).

Ayçiçeği bitkisinde farklı eksplant kaynakları (bitki parçaları) kullanılarak direkt (Pugliesi ve ark. 1991) ve indirekt organogenesis (Greco ve ark. 1984), somatik embriyogenesis (Paterson ve Everett 1985, Wilcox ve Cooley 1987, Gelebart ve San 1987, Freyssinet ve Freyssinet 1988, McCann ve ark. 1988, Wirtzens ve ark. 1988, Badea ve ark. 1989, Pelissier ve ark. 1990, Prado ve Berville 1990, Thengane ve ark. 1994, Jeannin ve ark. 1995) aracılığıyla regenerasyon sağlanmıştır. Birçok hibrid ve saf hatlar organogenesis (Ceriani ve ark. 1992) veya somatik embriyogenesis (Paterson ve Everett 1985, Fiore ve ark. 1997) gibi doku kültürü yöntemleri kullanılarak regene edilebilse de, ayçiçeği regenerasyon ve transformasyon çalışmaları açısından inatçı bitki (recalcitrant bitki) yani biyoteknolojik yöntemlere kolay tepki vermeyen bitki grubu içersinde yer almaktadır.

Tek bir faktör yada birkaç faktörün birlikte etki etmesi ayçiçeği bitkisinin *in vitro* regenerasyonu üzerinde etkili olmaktadır. Ayçiçeği bitkisinin regenerasyonunda etkili olan faktörler; genotip (Paterson 1984, Power 1987, Dağüstü 2002), besi ortamının bileşimi (Paterson 1984), kullanılan eksplant kaynaklarının yaşı (Paterson ve Everett 1985, Knittel ve ark. 1992, Dağüstü 2002), bitki parçası türü (Ceriani ve ark. 1992, Dağüstü 2002), çevresel faktörler (Fiore ve ark. 1997) ve regenerasyon yöntemleridir (Paterson 1984).

Bitki regenerasyonunda kullanılan eksplant kaynakları; apikal meristem (Paterson ve Everett 1985), olgunlaşmış embriyo (Özyiğit ve ark. 2007), olgunlaşmamış embriyo (Encheva ve ark. 2004, Thomas ve ark. 2004), anter (Nurhidayah ve ark. 1996), protoplast (Monique ve ark. 1991, Aurori 2011), kotiledon parçası (Pugliesi ve ark. 1991, Khalid ve ark. 1992) ve hipokotil parçasıdır (Fabijan ve ark. 1981, Greco ve ark. 1984).

Embriyogenik özelliklere sahip kallus üretimi bitki regenerasyon çalışmalarında optimum düzeyde bitki eldesi için kullanılan indirekt üretim yöntemlerinden birisi olup eksplantlardan direkt üretim yöntemlerinden daha fazla sayıda bitki eldesine olanak sağlamaktadır (Hahne 2001). Ayrıca eksplanttan büyük oranda kallus eldesi *in vitro* seleksiyon ve genetik çeşitlilik elde etmek için önemlidir (Espinasse ve Lay 1989).

Günümüzde ayçiçeği bitkisinde basit, etkili, hızlı, üniform ve genotipten bağımsız bir regenerasyon yöntemi henüz geliştirilmemiş olup bu konuda çalışmaların yoğunlaştırılması gerekmektedir. Yürütülen yüksek lisans çalışmasında ayçiçeği

bitkisinde genotipten bağımsız optimum somatik embriyo ve/veya organogenesis olanağı sağlayacak yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Alibert ve ark. (1994), ayçiçeği bitkisinde hücre ve doku kültürü teknikleri ve bu tekniklerin biyoteknolojide kullanımı üzerine yaptıkları derlemede, kültürü yapılan ayçiçeği gen kaynaklarının oldukça kısıtlı olmasından dolayı eşeyssel bariyerlerin üstesinden gelinmesi için biyoteknolojik tekniklerin uygulanmasının arzu edildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada yeni teknolojilerin gelişmesinde protoplast, doku veya organlardan tam teşekküllü fertil bitkilerin bozulmadan regenerere edilebilme yeteneklerinin elde edilmesinin gerekli olduğunu savunmuşlardır. Sonuç olarak, tüm yeni metotların rutin olarak kullanılmadan önce geliştirilmesi gerektiğini ve gelecekte biyoteknolojik uygulamalardan yararlanılarak ayçiçeğinin kendi potansiyeline bağlı olarak yağlı tohumlu ürünler arasında çok karlı bir ürün haline gelebileceğini öngörmüşlerdir.

Ayçiçeği fidelerinin hipokotillerinden elde edilen eksplantlarda adventif köklenme çalışan Fabijan ve ark. (1981), hipokotillerdeki ilk kök oluşumlarının başlangıcının ilk 24 saat içinde geliştiğini, karanlıkla uygulamasında hipokotillerin tüm kısımlarında köklenmenin olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca ana kök sisteminin kesilerek uzaklaştırılmasından 24 saat sonra hipokotil eksplantlarının sapa bağlanan kısmında yer alan hücrelerde ilk sitolojik değişikliklerin görülmeye başladığını bulmuşlardır. Genç ayçiçeği fidelerinden elde edilen hipokotillerden adventif köklerin oluşumunun, hormon ve besi ortamı faktörlerinin kontrolü altında olduğu sonucuna varmışlardır.

Greco ve ark. (1984), ayçiçeğinde sürgün regenerasyonu ve kallus indüksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada, çeşitli konsantrasyonlarda oksin (2,4-diklorofenoksiasetikasit; 2,4-D) ve/veya sitokinin (6-benzilaminopurin; 6-BAP) ilave edilmiş Murashige ve Skoog (MS; 1962) besi ortamında ayçiçeğinin yaprak ve kotiledon parçalarını, sürgün uçlarını ve hipokotil segmentlerini geliştirmişlerdir. Sonuçların eksplant tipine ve hormonal muameleye göre farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada, 6-BAP kullanarak farklı eksplantlardan kallus oluşumunu başarmışlardır. 2,4-D tek başına kullanıldığında nodül şeklinde zayıf gelişen kallus oluştururken 6-BAP tek başına kullanıldığında çok iyi gelişen kompakt yapılı yeşil renkli kallus oluşumuna neden olmuştur. 6-BAP ortamında kallus indüksiyonu gerçekleşen yapılardan birkaçı çok

sayıda sürgün oluşturmuş ve bu sürgünlerin bazılarında da *in vitro* çiçeklenme sağlamışlardır.

Paterson ve Everett (1985), kendilenmiş ayçiçeği bitkilerinden elde edilen kallusların regenerasyon yeteneğini belirleme çalışmasında, 100 deneysel kendilenmiş ayçiçeği hattının kültüre alınan yapraklarından adventif sürgün gelişme yeteneklerini test etmişlerdir. Bu amaçla denedikleri farklı kültür ortamlarında (MS, N6, White ve B5) en büyük regenerasyon oranını MS, en fazla kallus oluşumunda White ortamından elde etmişlerdir. Geliştirdikleri sistemde, NAA, BA ve GA₃'ün optimum regenerasyon için gerekli olduğu ve GA₃'in ilave edilmesi ile regenerasyon oranının arttırdığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber, 11 günden daha uzun süre çimlenmiş tohumlardan alınan hipokotil eksplantlarında regenerasyon oranının arttığı belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, yapılan bu çalışmada büyük bir genotipik varyasyon olduğu ve besi ortamında bulunan nitrat konsantrasyonuyla eksplantların alındığı fidelerin yaşının etkili bir regenerasyon için önemli bir etken olduğu belirlenmiştir.

Finer (1987), ayçiçeği hibridlerinin tozlanmasından 7-14 gün sonra elde ettiği olgunlaşmamış embriyolardan, yüksek oranda sukroz içeren (% 12) besi ortamlarında direkt somatik embriyogenesis ve bitki regenerasyonu elde ettiği çalışmasında, somatik embriyoların *in vitro* kültürün 6. gününden itibaren oluştuğunu gözlemlemiştir. Somatik embriyoların kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu olmadan direkt geliştiğini ve regenere olarak bitkicik oluşturduğunu tespit etmiştir.

Lupi ve ark. (1987), ayçiçeğinde sürgün ucu kültürü ve kallustan bitkicik oluşumunu inceledikleri araştırmalarında, kallus indüksiyonu, adventif sürgün regenerasyonu, sürgünlerin çoğaltılması ve köklendirilmesi için oluşturdukları yöntemde, 2 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BA içeren MS ortamında hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kallus oluşturmuşlardır. Adventif sürgünleri, 0.5-2.0 mg/L BA içeren ortamda hipokotil segmentlerinden elde ederken, % 1.5 sukroz konsantrasyonunun hipokotillerden sürgün regenerasyonu için optimum olduğunu ve sürgün uçlarının çoğaltılması için destekleyici olarak 2 mg/L kinetine ilaveten 5-10 mg/L GA₃, 2 mg/L veya düşük oranlarda (1 mg/L) BA ve 10 mg/L GA₃ kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Knittel ve ark. (1991), olgun ayçiçeği tohumlarının çimlenmiş fidelerinin kotiledonların da yüksek oranda bitki regenerasyonu elde ettikleri çalışmalarında, 10 g/L sukroz içeren ½ MS ortamında 3 gün karanlık 2 gün aydınlık kültür şartlarında denemelere bağlı olarak 1-5 gün çimlendirdikleri tohumlardan aldıkları kotiledon eksplantlarını 2 ve 4'e bölerek Paterson ve Everet (1985) ortamının farklı hormon konsantrasyonlarında (BAP/NAA) inkübe etmişlerdir. Bu çalışmada genç çimlendirilmiş fidelerden alınan kotiledonlar kullanılarak etkili bir regenerasyon sistemi oluşturulmuş ve kotiledon başına 10 sürgün elde edilmiştir. Araştırma sonuçlarında, fiziksel kültür şartlarının regenerasyon üzerine etkisinin az olduğu, eksplant tipi, yaşı ve genotip kadar besi ortamının hormon dengesi ve ortamda bulunan azot kaynağının niceliksel ve niteliksel açıdan regenerasyon üzerinde önemli faktörler olduğu açığa çıkarılmıştır.

Pugliesi ve ark. (1991), ayçiçeği doku kültürlerinde genetik değişkenlik ve bitki regenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, ayçiçeği kotiledonlarının *in vitro* kültürlerinden adventif sürgünler elde etmişlerdir. Oksin ve sitokinin arasındaki interaksyonun, kotiledonların yaşının ve 2,3,5-triiodobenzoik asit (TIBA) muamelelerinin sürgün regenerasyonu üzerinde etkili olduğunu bulmuşlardır.

Ceriani ve ark. (1992), ayçiçeği bitkisinde rutin bir regenerasyon için eksplant kaynağı olarak kotiledonları kullandıkları çalışmalarında, direkt regenerasyon (organogenesis) veya yüksek regenerasyon kapasiteli kallus oluşumu (indirekt regenerasyon) elde etmişlerdir. Doku kültürü şartlarında histolojik modifikasyon analizleri, ana dokudan ayrılan ve bol meristematik yapı içeren kotiledonun alt segmentinin gelişerek bitki regenerasyonuna izin verdiğini göstermiştir. Test ettikleri ticari kendilenmiş hatlar ve Arjantin'de üretimde yaygın olarak kullanılan hibridleri içeren toplam 20 genotip arasından 10 tanesi için uygun regenerasyon protokolü oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda ayçiçeği regenerasyonu için seçilebilecek en iyi eksplant kaynağının kotiledon olduğunu belirlemişlerdir.

Khalid ve ark. (1992), ayçiçeği kotiledon eksplantlarından genotipe bağımsız regenerasyon sistemi geliştirmede etilenin rolünü araştırdıkları çalışmalarında, 3 günlük çimlenmiş tohumlardan aldıkları kotiledon eksplantlarını 5.4 µM NAA ve 4.4 µM BAP

içeren Modifiye MS sıvı kültür ortamında 3 gün boyunca inkübe ettikten sonra yine aynı ortamı agarla katılaştırarak alt kültür işlemi gerçekleştirmişlerdir. Kültürün 4. haftasında elde ettikleri sürgünleri köklendirme ortamında köklendirmişler ve bitkicikleri başarılı bir şekilde dış ortama alıştırarak fertil bitkiler elde etmişlerdir. Geliştirilen regenerasyon protokolü önceki çalışmalarda regenerasyon yeteneğinin olmadığı tespit edilen 19 genotipe sürgün oluşumunu ve zayıf regenerasyon yeteneğine sahip genotiplerin regenerasyon kapasitesini artırdığını göstermiştir. Yarı-katı ortam kültürünün 3. gününde etilen hormonu üretimi maksimum seviyeye ulaşırken, sıvı ortam kültüründe bu hormonun üretimi çok azalmıştır. Bu çalışmada, sürgün regenerasyonunun başlatılmasının etilen hormonu tarafından kontrol edildiği ve test edilen 30 genotipe ait eksplantların sıvı kültür ortamında inkübe edildiği periyot boyunca etilen hormonunun üretimini azalması nedeniyle regenerasyon sağlandığı belirlenmiştir.

Punia ve Bohorova (1992), ayçiçeğinin 6 yabancı türünün (*Helianthus nuttallii* Tats, *H. mollis* Lam, *H. divaricatus* L., *H. debilis* Nutt, *H. maximilliani* S., *H. Praecox* E&G) 1 aylık çimlenmiş tohumlarından temin edilen 4 farklı eksplant kaynağını (sap, yaprak, sürgün ve kotiledonlar) kallus ve bitki regenerasyonu için farklı ortamlarda kültüre almışlardır. Kallus regenerasyonunu 1 mg/L BAP, 0.1 mg/L GA₃, 500 mg/L kasamino asit ve 40 mg/L adenin sülfat ilave edilmiş MS ortamında sağlamışlardır. Test ettikleri tüm yabancı genotiplerde gövde, tomurcuk ve yaprak eksplantlarından yüksek oranda kallus oluşumu elde edilmiştir. Kotiledon eksplantlarında diğer eksplantlara nazaran daha düşük oranda kallus oluşumu gözlenmiş ve kotiledon eksplantından elde edilen kalluslarda regenerasyon görülmemiştir. Araştırma sonuçları, genotip, eksplant ve besi ortamının kallus gelişiminde önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır.

Deglene ve ark. (1997), ayçiçeği kotiledonlarında organogenesisin genetik kontrolü konusunda yaptıkları çalışmalarında, genetik çeşitlilik için 13 farklı genotipten (3 sitoplazmik erkek kısır (CMS), 3 sürdürücü, 3 restorer (hibrid ıslahında kullanılan baba hat) kendilenmiş hat ve 4 kendilenmiş hattın birbirleriyle melezlenmesinden elde edilen F1 hibridleri) sağlanan kotiledonlarda direkt organogenesis ile regenerasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. İki günlük çimlenmiş tohumlarından sağlanan kotiledon

eksplantları enine kesilerek 4 eksplant olarak % 0.5 KNO₃, % 0.05 kasein asit hidrolaz, % 0.01 mio inositol, % 3 sukroz ve 4.4 µM BA ve 5.4 µM NAA ilave edilmiş, hormonsuz modifiye MS ortamında kültüre alınmış ve 4 hafta sonra direkt organogenesisle bitki regenerasyonu gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, birçok genotipte organogenesis parametreleri üzerinde eklemeli genlerin (additive genler) genetik yapının kontrolünde etkili olduğu bildirilmiştir.

Fambrini ve ark. (1997), *Helianthus annuus* x *H. tuberosum* melezlerinden regene olan bitkilerde yüksek embriyogenik potansiyel elde etme üzerine yaptıkları çalışmada, tetraploid interspesifik hibridlerin farklılaşma gösteren dokularının büyüme düzenleyicileriyle uyarılarak kallus oluşumunun indükte edilebileceğini ve nadir olarak da bu oluşumların bazılarında somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis oluşumlarının gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu ikinci kez in vitro hücre kültürü döngüsüne maruz bırakılan regene edilen bitkilerin eksplantlarında yüksek embriyogenik potansiyel gözlenmiştir. Embriyogenik potansiyelin bir organla kısıtlı olmadığı, tüm bitkiye bitki gelişimi boyunca yayılmış olduğu ve büyüme regülatörlerinin yokluğunda birçok kez alt kültür yapılırsa bile embriyogenik potansiyelin kaybolmadığı görülmüştür.

Fiore ve ark. (1997), ayçiçeği kotiledonlarından somatik embriyogenesis aracılığıyla yüksek oranda bitki regenerasyonu elde ettikleri çalışmada, embriyogenesis oranının (% 33-72) genotipe bağlı olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada, kotiledon eksplantlarından embriyogenik kallus elde etmek için en uygun çimlendirme süresinin 4-5 günde çimlenmiş fidelerden alınan bitki parçalarının oluşturduğunu ve somatik embriyogenesis oluşumunun sadece embriyo indüksiyon ortamında (EIM1) meydana geldiğini gözlemlenmiştir. Embriyogenik kallus oluşumunu kotiledon yapraklarının ana sapa doğru bağlanan alt kısmın üst yüzeylerinde, kültürün 10-12. gününde, hem çimlendirme hem de EIM ortamının (15 gün) karanlık olduğu muameleden elde etmişlerdir. Çalışmalarında, kotiledon yapraklarından yüksek oranda somatik embriyogenesis ve bitki regenerasyonu elde etmek için hem çimlendirme, hem de embriyo geliştirme ortamında karanlık uygulamasının gerekli olduğu sonucunu saptamışlardır.

Dağüstü ve ark. (1998), ayçiçeğinde *in vitro* regenerasyon ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen transferi konusunda yaptıkları çalışmalarında, 4 farklı ayçiçeği çeşidinin ait MS ortamında çimlendirilmiş tohumlarından alınan hipokotil ve kotiledon eksplantlarını 1:1 oranında BAP ve NAA içeren regenerasyon indüksiyon ortamında karanlıkta 2 hafta süreyle kültüre aldıktan sonra, 1:2 oranında oksin ve sitokinin içeren MS çimlendirme ortamına aktarmışlardır. *In vitro* koşullarda yetiştirdikleri 3 günlük ayçiçeği fidelerinden elde edilen meristemleri *Agrobacterium tumefaciens* Agl-1 ırkı ile birlikte kültüre alarak, 0.1 mg/L BAP, 100 mg/L kanamisin ve 500 mg/L sefotaksim içeren MS ortamında gelişen olası transgenik bitkileri PCR analiziyle test etmişlerdir. Araştırma sonuçlarında, yalnız kotiledon parçalarının % 4-10 oranında embriyoya benzer kallus oluşturduğunu ve genç kotiledonların, daha geç yaşta alınan kotiledonlara göre daha çok embriyonik kallus ürettiğini, geç yaşta alınan kotiledonların ise daha çok kök oluşturma eğiliminde olduğunu açığa çıkarmışlardır.

Gürel ve Kazan (1998), ayçiçeğinde etkin bir bitki regenerasyon sisteminin geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmalarında, farklı eksplant tipleri ve hormon konsantrasyonlarını karşılaştırmışlardır. Çalışma sonuçlarında, kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde ederken, somatik embriyo ve kök üretiminde genotipik varyasyonun ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. Sürgün ucu eksplantlarından sürgün üretimi bakımından 10 farklı ayçiçeği genotipi karşılaştırıldığında, söz konusu varyasyonun belirgin olarak ortaya çıktığını göstermişlerdir. Bununla beraber, hipokotil segmentlerinden elde edilen ince hücre katmanları ise bitki regenerasyonu açısından başarılı bulunmamıştır.

Nestares ve ark. (1998), ayçiçeğinde sitoplasmik faktörlerin regenerasyon yeteneği üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 12 farklı ayçiçeği kendilenmiş hattın (6 CMS, 6 sürdürücü) tohumlarından elde edilen kotiledonlarını farklı hormon kombinasyonları içeren [1)2 mg/L kinetin+1 mg/L IAA 2)0.5 mg/L BA+0.5 mg/L IAA] MS ortamında kültüre alarak, kültürden 30 gün sonra regenerasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. CMS ve sürdürücü hatlar arasında ikinci kültür ortamında (M2) inkübe edilen eksplantların regenerasyon yeteneği değerlerinde önemli farklılıklar

bulmuşlardır. Kullanılan hatlar için, çekirdek ve sitoplazma arasındaki interaksyonun ele alınan genotiplerde regenerasyon yeteneğini etkilediğini belirlemişlerdir.

Baker ve ark. (1999), olgun ayçiçeği kotiledonlarından kök ve sürgün oluşumunun geliştirilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada, eksplant yaşını, bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarını ve sürgün oluşumu aşamasında bitki büyüme düzenleyicilerine maruz bırakma sürelerini optimize ederek, ayçiçeği kotiledonlarından sürgünlerin gelişimini ve köklenmeyi sağlamışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, 1 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen kotiledonlar en yüksek regenerasyon oranını ve eksplant başına en fazla sürgün oluşumunu vermiştir. Bununla beraber, en çok sürgün üretimini 0.5 mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren ortamda kültüre alınmış ve ana bitkiye bağlanma noktalarına yakın yerlerden kesilmiş kotiledon eksplantlarından elde edilmiştir. Kültürün ilk 2 haftası içinde en yüksek sürgün oluşumunu ve kültürün son 2 haftası içinde de en yüksek sürgün gelişimi, kallus çoğalması ve sürgün camsılaşmasını gözlemlemişlerdir.

Muhammed ve ark. (1999), *Helianthus annuus* L. bitkisinin tohumlarında *in vitro* morfogenez potansiyelini belirlemek üzerine yaptıkları çalışmada, ayçiçeği ıslah programında kullanılan SF-187 ticari hibridinin *in vitro* morfojenetik sonuçlarını gözlemlemişlerdir. Araştırma sonucuna göre, 2 mg/L BAP ve NAA ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınan bir eksplant maksimum 50 bitkicik oluşturmuş ve regenerasyon alan bitkicikler 0.5 mg/L NAA ilave edilmiş MS ortamında alt kültüre alınarak köklendirilmişlerdir. Köklendirilen bitkiciklerin % 90'dan fazlası hayatta kalmış ve kültürden 8 hafta sonra çiçeklenmeye başlamışlardır. Ancak *in vitro* çiçeklenme sonucu fonksiyonel tohum elde edilememiştir. Bununla birlikte, 2 mg/L'den daha yüksek konsantrasyonlarda NAA ve BAP içeren ortamlardan elde edilen kallusların, regenerasyon alan bitkicik oluşturma yeteneklerinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Shin ve ark. (2000), çeşitli ayçiçeği genotiplerinde etkili bir sürgün regenerasyonu geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 17 farklı ayçiçeği genotipinin çimlendirilen tohumlarında, farklı eksplant yaşı (çimlenmeden 2, 3, 4, 5, 6 veya 8 gün sonra), sitokinin çeşidi [BA, N⁶-(2-izopentenil) adenin (2-iP), kinetin ve zeatin] ve

konsantrasyonu (BA; 2, 4, 8, 16 ve 32 μ M), bazal ortam (Anderson, B5, MS ve WPM) ve eksplant kaynağını (kotiledon, çimlenmiş tohumlardan elde edilen meristematik doku, yaprak sapı, olgun veya ana yapraklar ve sap) araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarında, çalışmada kullanılan 17 genotipin çimlenmiş tohumlarından elde edilen meristematik dokuları ve ilk yaprak dokuları gibi genç eksplantlarından rutin bir regenerasyon sağlanmıştır. En yüksek sürgün regenerasyon oranları 5 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilmiştir. Eksplant yaşının ilk yaprak dokuları ile karşılaştırıldığında embriyo meristem eksplantlarında sürgün regenerasyonu bakımından önemli bir farklılık yaratmadığını saptamışlardır. Test edilen bazal ortamlar arasında MS ve B5 bazal ortamından, kullanılan diğer bazal ortamlara göre daha yüksek oranlarda sürgün regenerasyonu elde edilmiş ve en yüksek sürgün regenerasyonu oranını oksin içermeyen 2 μ M BA ilave edilmiş MS ortamının verdiği araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, ortama ilave edilen 1 μ M NAA'nın eksplant başına ortalama sürgün sayısını ve sürgün üreten eksplant yüzdesini önemli bir oranda düşürdüğü bulunmuştur.

Azadi ve ark. (2002), ayçiçeği kotiledon eksplantlarından sürgün regenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, 23 farklı genotipin olgun tohumlarının 2 günlük çimlenmiş fidelerinden alınan kotiledon eksplantlarını farklı kombinasyonlarda NAA ve BAP içeren MS + % 3 sukroz+ % 0.5 agar dan oluşan sürgün geliştirme ortamlarına aktarmışlardır. Araştırma sonuçlarında, çalışmalarında kullandıkları ebeveyn genotipler ve hibrid hatlar arasında, farklı hormon kombinasyonları, hormon kombinasyonları X genotip interaksyonları arasında organogenesis elde etme açısından istatistiki olarak önemli farklılıklar olduğunu saptamışlardır. Sürgün regenerasyonunu 1.0 mg/L BAP/ NAA içeren MS ortamında optimize etmişlerdir.

Ayçiçeğinde *in vitro* bitki regenerasyon kapasitesinin kalıtsallığını araştıran Nestares ve ark. (2002), 20 kendilenmiş hattın hormonsuz MS ortamında 4 gün çimlenmiş fidelerinden elde ettikleri kotiledonları dikey olarak ikiye bölmüşler ve tekrar uzunlamasına ikiye bölerek elde ettikleri eksplant parçalarını, farklı büyüme düzenleyicileri içeren (2 mg/L kinetin+1 mg/L IAA; 3 mg/L BA) 2 farklı MS kültür ortamında 4 hafta süre ile kültüre alarak regenerasyon yeteneklerini

değerlendirmişlerdir. Kallus oluşturan eksplantların yüzdesi, çoğalma oranı, aşırı büyüyen eksplantların yüzdesi, sürgün oluşturan eksplantların yüzdesi ve organogenik eksplantların yüzdesini gibi *in vitro* parametreleri değerlendirdiklerinde kendilenmiş hatlar arasında önemli farklılıklar bulmuşlardır. Bütün değişkenler açısından besi ortamının etkisi önemli bulunmuştur. Regenerasyon yeteneğinin, kültür ortamı, genotip ve bunların interaksiyonundan etkilendiğini gözlemlemişlerdir. Organogenik eksplantların kalıtım değerlerinin 0.45-0.74 arasında değiştiğini göstermişlerdir.

Yordanov ve ark. (2002), *Helianthus eggertii* × *Helianthus annuus* melezinden elde edilen 18 geri melez, 1 F1 hibridi 2 ebeveynde *in vitro* bitki regenerasyon potansiyelini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada geri melezlerden elde ettikleri bitkilerin yaprak (0.5 cm²), kök (0.5 cm) ve sap (0.5 cm) eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda NAA, BAP (0-9.2 µM) ve AgNO₃, kasein hidrolizat, adenin sülfat ve KNO₃ ilave edilmiş MS ortamlarında kültüre almışlardır. En iyi regenerasyon sonuçlarını, F1 hibridlerinin yaprak eksplantlarının ve 8.8. µM BA, 1.08 µM NAA içeren kültür ortamında geliştirilmesinden elde etmişlerdir. Kültür ortamına ilave edilen kasein hidrolizatın regenerasyonu arttırdığını gözlemlenmiştir.

Abdoli ve ark. (2003), ayçiçeğinde genotip ve kesilen kotiledon kısımlarının organogenesisine etkisini belirledikleri araştırmalarında, 2 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen kotiledon eksplantlarını enlemesine ortadan ikiye bölerek 4.4 µM BAP ve 5.4 µM NAA ilave edilmiş MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonuçlarında genotip ve kotiledon eksplantlarının enlemesine kesilen üst ve alt kısımları arasında organogenesis oluşturma açısından önemli farklılıklar bulunmuştur. Yaptıkları çalışmada, sürgün organogenesisini kotiledon eksplantının sapa yakın kısımlarında optimize etmişlerdir.

Arda (2004), Türkiye Trakya bölgesinde yetiştirilen verimli ayçiçeği hibridlerinde kallus oluşumu ve *in vitro* regenerasyon üzerine yaptığı çalışmasında, 15 farklı ayçiçeği hibridinin ve kontrol grubu olarak 1 yerli çeşidin tohumlarını, 3 farklı yöntemle göre [1) Tohum kabukları soyulmadan yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra MS ortamında çimlendirme, 2) Tohum kabukları soyularak yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra MS

ortamında çimlendirme, 3) Tohum kabukları soyulmadan yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra nemli pamuk ortamında çimlendirme] çimlendirdikten sonra farklı eksplant kaynaklarını (kotiledon, hipokotil, kök ve genç yapraklar) farklı hormon konsantrasyonları içeren ortamlarda kültüre almıştır. Çalışma sonuçlarında, 3. sterilizasyon yöntemi çimlenme için en iyi sonucu verirken, farklı hormon konsantrasyonları içeren ortamlar arasında 0.1 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamı en iyi sonucu vermiştir. Hipokotil ve kotiledon eksplant kaynaklarından en iyi sonuçları alırken, yerli ve hibrid çeşitler arasında kallus oluşumu ve regenerasyon değerlerinde önemli farklılıklar bulunmuş ve hibrid çeşitlerin regenerasyon etkinliğinin daha düşük olduğunu gözlemlemiştir.

Taški-Ajduković ve Vasić (2005), ayçiçeği tohumlarında tohumla birlikte taşınan bakteriyel enfeksiyonu ortadan kaldırmak amacıyla 5 farklı sterilizasyon yöntemini denedikleri çalışmalarında, % 14'lük ticari çamaşır suyunda 20 dk. bekleterek steril ettikleri tohumları, 3 kez steril suyla çalkaladıktan sonra, kabukları soyulmuş tohumları % 5'lik NaOCl konsantrasyonunda 60 dk. bekletmişler ve 3 kez saf su ile çalkalayıp, 60 dk. 45 °C kuru sıcaklıkta tutarak en yüksek çimlenme oranı ve en düşük bulaşma oranını elde etmişlerdir.

Özyiğit ve ark. (2006), olgun ayçiçeği embriyolarından kallus indüksiyonu ve bitki regenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, 5 farklı ayçiçeği genotipini ve çeşitli büyüme düzenleyicilerinin ilave edildiği MS ortamlarını kallus gelişimi ve etkili bir sürgün ve kök organogenesisi elde etmek için kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada, kallus indüksiyonu için 1mg/L 2,4-D ilave edilmiş MS ortamını, sürgün regenerasyonu için 1 mg/L BA ve 0.5 mg/L NAA ilave edilmiş MS ortamını ve regene olan sürgünleri köklendirmek için hormonsuz 1 mg/L IBA (indole-3-bütirik asit) ilave edilmiş MS ortamlarını kullanmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda, kallus indüksiyonunu test edilen tüm genotiplerde % 80-92 oranında sağlarken, ele alınan genotipler içerisinde en yüksek sürgün regenerasyonunu Trakya 259 genotipinde % 44 oranında sağlamışlardır.

Vega ve ark. (2006), ayçiçeği kotiledonlarında direkt organogenesis için uygun regenerasyon bölgelerini araştırdıkları çalışmalarında, 6 kendilenmiş hattın 4 günlük çimlenmiş tohumlarından elde edilen kotiledonların 3 farklı bölgesinin (uç kısımdan, orta kısımdan ve sapa yakın olan kısımdan) tekrar uzunlamasına ikiye bölünmesinden elde edilen kotiledon eksplantlarını (toplam 7 parça), 87.7 mM sukroz, 1.37 mM glutamin, 9.30 µM Kinetin (KIN), 5.71 µM Indol asetik asit (IAA) ve % 0.9 agar içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Genotip ve eksplantlar arasında regenerasyon yeteneği ve sürgün oluşturma potansiyeli açısından istatistiki olarak önemli farklılıklar bulmuşlardır. Çalışmalarında, sapa yakın kısımlardan alınan eksplant parçalarından uç kısımlardan alınan eksplant parçalarına doğru gidildikçe regenerasyon kapasitesinde düşme olduğunu saptamışlardır.

Özyiğit ve ark. (2007), ayçiçeğinde genotipe bağlı sürgün regenerasyonu ve kallus indüksiyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, genotip, hormon ve kültür şartlarının ayçiçeğinde kallus indüksiyonu ve indirekt bitki regenerasyonuna etkisini incelemiştir. Ele alınan tüm genotiplerin kallus ve sürgün regenerasyonu hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilmiştir. Yaptıkları çalışma sonucunda, genotipik farklılığın ayçiçeği doku kültürü çalışmalarında, kallus indüksiyonu ve bitki regenerasyonu için önemli olduğunu bulmuşlardır.

Dağüstü ve ark. (2008), ayçiçeğinde *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon ve yüksek kallus indüksiyonu üzerine yaptıkları incelemede, genetik çeşitlilik ve transformasyon çalışmalarını kolaylaştırmak için embriyogenik eksenlerin transformasyonda kullanıldığı hipokotil ve kotiledon eksplantlarından optimum kallus indüksiyonunun gerçekleştiği ve ayçiçeğinde regenerasyon kapasitesinin optimuma çıkarıldığı bir prosedür geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, kotiledon eksplantlarının hipokotil eksplantlarından daha düşük oranlarda kallus üretmesine rağmen, somatik embriyo ve direkt sürgün regenerasyonu kapasitesinin hipokotil eksplantlarından daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Hipokotil eksplantlarından sadece kök regenerasyonu elde etmişlerdir. Bununla beraber, embriyo ve sürgün regenerasyonunun genotip ve eksplant kaynağına bağlı olarak % 0-29 arasında değiştiği sonucuna varmışlardır. Ayçiçeğinde transformasyon için, tohumlardan ayrılmış embriyogenik eksenleri A.

tumefaciens ile birlikte kültüre almışlar ve *Erwinia uredovora* phytoene desaturase (*crtI*) veya hydroxymethylglutaryl-CoA (Hmgr-CoA) genlerini içeren olası transgenik ayçiçeği bitkilerini elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada, olası transgenik bitkiler kanamisin içeren ortamlardan seçilmiş, PCR ve *nptII* aracılığıyla transformasyon doğrulanarak elde edilen yeşil sürgünler köklendirme ortamına transfer edilmiştir. Çalışmada *in vitro* kültür şartlarında yetiştirilen bitkiciklerin erken çiçeklenme gösterme eğiliminde olduğu saptanmıştır.

Börülce, sorgum ve çeltik tohumlarının yüzey sterilizasyonunda üç farklı uygulamayı [1. % 70, 85, 90, 95 etil alkol+5, 10, 15, 30 dk.; 2. % 3.5 NaOCl+5, 10, 15, 20, 30, 45 dk.; 3. % 90 etil alkol+3 dk., % 3.5 NaOCl+30 dk.] deneyen, Oyebanji ve ark. (2009), 20-45 dk. sürelerde uygulanan % 3.5 NaOCl konsantrasyonunun yüzey sterilizasyonu sağlama açısından maksimum sonucu (% 0 bulaşma) verdiğini bulmuşlardır.

Anitha ve ark. (2011), ayçiçeğinde yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, 5 ayçiçeği genotipinde farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonlarının, 7 günlük fidelerinden alınan 3 farklı eksplant kaynağının (hipokotil, kotiledon, primordial yapraklar) kallus indüksiyonu ve regenerasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. 2,4-Diklorofeksiasetik asit (2,4-D)+ Kinetin ilave edilen MS ortamına nazaran içersinde Naftalinasetik asit (NAA) ve Benzil adenin (BA) ilave edilmiş MS ortamında tüm eksplantlarda en iyi kallus indüksiyonunu elde etmişlerdir. Ele alınan 10 uygulama içersinde kallus oluşumu bakımından maksimum gelişmeyi 0.5 mg/L BA ilave edilmiş kültür ortamından sağlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, NDSH-1 genotipi hem rhizogenesis hem de kallus indüksiyonu açısından en iyi gelişmeyi gösterirken DRSH-108 genotipi kallus oluşumu bakımından diğer genotiplerden daha iyi sonuç vermiştir.

Aurori (2011), ayçiçeğinde protoplast, doku ve eksplantlarda organogenesis ve somatik embriyogenesis üzerinde etkili olan bazı faktörleri incelediği çalışmasında, eksplant yaşının kotiledon eksplantı ve embriyonik eksen için regenerasyon üzerinde aynı derecede önemli olduğu fakat her iki eksplantında farklı ortamlara gereksinim duyduğu sonucuna varmıştır. Yapılan çalışmada, ayçiçeğinde farklı çimlenme sürelerinden (1-6 gün) alınan embriyogenik eksen ve kotiledon kısımlarının regenerasyon potansiyellerini

araştıran bilim adamı denemelerde kullanılan eksplantın alınma kaynağına bağlı olarak çimlenmemiş olgun embriyolardan alınan embriyogenik aksis eksplantları ve 2 günlük çimlenmiş embriyolardan elde edilen kotiledon eksplantlarında en iyi sürgün regenerasyonu sağlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre optimum regenerasyon elde edilmek isteniyorsa ele alınan eksplant tipine bağlı olarak eksplant yaşının belirlenmesi gerekmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Denemelerde kullanılacak olan ayçiçeği genotipleri dört farklı kaynaktan (Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bursa; TMT Ltd. Şti. Tekirdağ; Agromar A.Ş., Bursa ve MayAgro Tohumculuk, Bursa) temin edilmiştir. Ayçiçeği tohumlarının farklı kaynaklardan temin edilmeleri konusuna özen gösterilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Araştırmada ele alınan ayçiçeği genotiplerinin özellikleri ve temin edildiği yer

Ayçiçeği Genotipleri	Özellikleri	Temin Edildiği Yer
Sirena	Hibrid	MayAgro Tohumculuk, Bursa
Pactol	Hibrid	Agromar A.Ş., Bursa
T0910182-3	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910285-1	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910131-1	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910182-2	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910791-3	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910930-2	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910791-4	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910791-1	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0911033-2	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910950-2	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910817-1	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910792-1	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
T0910241-3	Kendilenmiş Hat	TMT Ltd. Şti., Tekirdağ
RHA 16	Restorer	U.Ü. Ziraat Fak. Tarla Bit. Böl., Bursa

3.2. Deneme Yeri ve Özellikleri

Araştırmanın yapıldığı Bursa ilinde iklim genellikle yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı olmaktadır. İlin uzun yıllar ortalaması olarak yıllık yağış toplamı 701.5 mm, en yüksek sıcaklık 42.6 °C, en düşük sıcaklık – 25.7 °C, ortalama sıcaklık 14.72 °C'dir. Tohum sayısını çoğaltmak amacıyla araziye yapılan 2010 yılı ekim ve bitki gelişim

döneminde yer alan ayların yağış, sıcaklık ve oransal nem değerleri ile aynı ayların uzun yılları kapsayan ortalama değerleri Çizelge 3.2 'de verilmiştir (Anonim 2010c).

Çizelge 3.2. Bursa ilinde uzun yıllar ortalaması ile denemenin yürütüldüğü yıla ait iklim değerleri

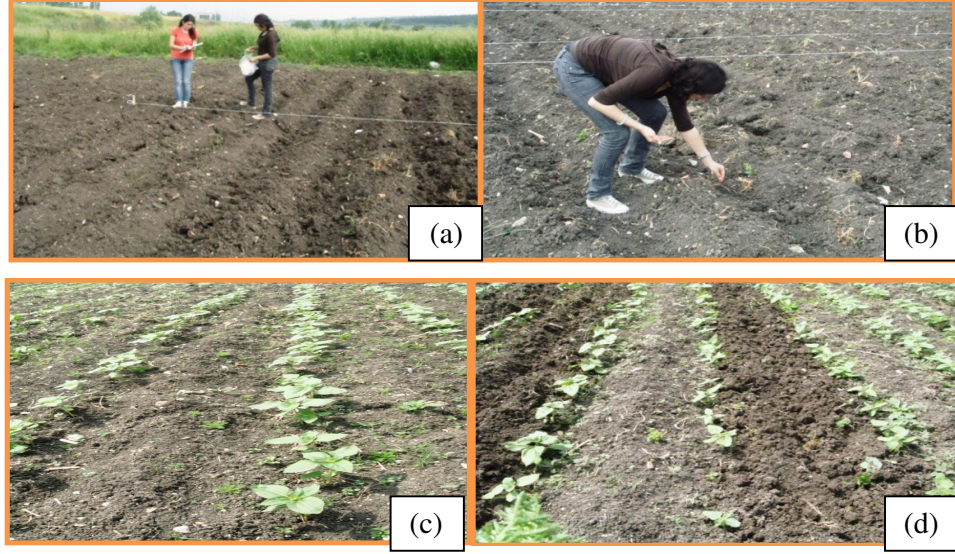
AYLAR	Uzun Yıllar Ortalaması (1975-2009)			2010		
	Sıcaklık (°C)	Ortalama Nem (%)	Yağış (mm)	Sıcaklık (°C)	Ortalama Nem (%)	Yağış (mm)
Mayıs	17.7	65.0	44.6	19.2	63.7	29.4
Haziran	22.4	58.0	34.6	22.4	70.8	135.2
Temmuz	24.6	57.0	17.7	25.4	67.2	25.0
Ağustos	24.4	60.0	18.9	27.5	62.5	5.2
Eylül	20.1	65.0	43.2	21.4	69.5	52.9
Toplam	-	-	159	-	-	247.7

Vejetasyon periyodu boyunca uzun yıllar ortalamasına düşen toplam yağış 159 mm olurken, 2010 yılında düşen toplam yağış 247.7 mm olmuştur.

Denemenin yürütüldüğü “Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi” toprakları kil ve marn katmanlı olup, neojen formasyon üzerinde oluşmuş, eğime bağlı olarak 50-200 cm kalınlıkta ve ağır bünyeli, ana maddeleri açık gri ya da beyaza yakın renkte olup, kil ve kireççe zengin materyallerdir (Katkat ve ark. 1985).

3.3. Arazi Koşullarında Yapılan Ekim ve Bakım İşlemleri

Ele alınan tüm genotipler 10.05.2010 tarihinde Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi deneme alanlarında sıra arası 70 cm sıra üzeri 20 cm olacak şekilde her bir genotip bir sırada yer alacak biçimde 5 m uzunluktaki sıralara ekilmiştir (Şekil 3.1.). Ekimden önce toprağa 5 kg/da etkili madde dozunda 15-15-15 (N, P, K) kompoze gübre elle serpilerek toprağa karıştırılmıştır. Daha sonra 1. sulamada 5 kg/da etkili madde dozunda N, % 46'lık üre formunda verilmiştir. Bitkiler, çıkış suyu ile birlikte çiçeklenme ve tane dolum dönemlerinde olmak üzere 3 defa yağmurlama sulama yöntemi ile sulanmıştır.



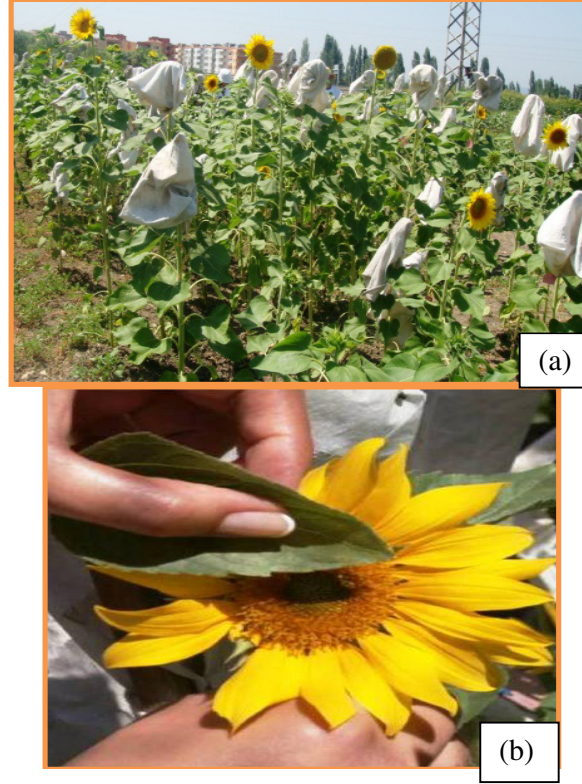
Şekil 3.1. Ayçiçeği genotiplerinin tohumlarını çoğaltmak amacıyla arazi koşullarında yapılan ekimler (a) Açılan çizilere genotiplerin bırakılması, (b) 20 cm sıra üzeri mesafesinde sıraya ekim, (c) Genotiplerin 20 gün sonra topraktan çıkışı, (d) Tekleme ve çapalama yapılan sıraların görünüşü

Bitkiler 4-6 yapraklı dönemdeyken teklemeye beraber, yabancı ot zararını önlemek amacıyla ilk çapalama yapılmıştır. Ayrıca 20-25 cm bitkiler boylandığında sıra araları kabartılmış ve boğaz doldurma işlemini takiben bitkiler çiçeklenme dönemine girdiğinde kök ve yaprakların kesilmemesine dikkat edilerek 3. çapalama yapılmıştır.

3.4. Kendilenmiş Ayçiçeği Hatlarının Elde Edilmesi

Ekimden sonra tablalar henüz çiçek açmamış ve yeşil iken, çiçeklenme aşamasında dışarıdan toz almaması için, 5-8 adet bitkinin tablası pamuklu bez torbalar ile kapatılmıştır (Şekil 3.2.).

Arazi şartlarında kolaylık sağladığı için kendilemeler, ayçiçeği bitkilerinden koparılan yapraklar aracılığıyla yapılmıştır. Bu yapraklar, bitkinin tablasında yumuşak bir şekilde gezdirilerek en dıştaki 3-4 sırada bulunan açan çiçeklerden alınan polenlerin, dişi organlar üzerine dağıtılması ve bu şekilde kendilenen tablaların tekrar bez torbalarla kapatılması şeklinde kendileme işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.2.). Kendileme işlemleri iki günde bir olmak üzere 4-5 gün boyunca sürmüştür.



Şekil 3.2. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerin bez torbalar ile izolasyonu (a) ve yaprak ile yapılan kendileme çalışması (b)

Hasat işlemi bitkinin sap ve yaprakları sarardığında, tabladaki tohumlar orta kısmına kadar olgunlaştığında (1.10.2010) tarihinde elle yapılmıştır. Harmanlama da elle yapılmış olup, elde edilen tohumlar sayılarak tablada tohum sayıları belirlenmiş ve kağıt keselere doldurulmuştur. Bu keselerin üzerlerine genotip isimleri ve tohum sayıları yazılarak buzdolabında (+4 °C) denemelerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.5. *In vitro* Koşullarda Yapılan Çalışmalar

3.5.1. Besi ortamları

Bu araştırmada ele alınan tüm tohumlar steril edildikten sonra eksplant kaynağını temin etmek üzere ½ MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamında çimlendirilmişlerdir. Ele alınan eksplant kaynaklarından embriyo ve organogenesis başlatmak üzere 5 farklı besi ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar; 1) Embriyo indüksiyon ortamı (EİO, Fiore ve ark. 1997), 2) Modifiye White besi ortamı (MWO, Wilcox ve Cooley 1987), 3) Anderson besi ortamı (ABO, George ve Sherrington 1984), 4) Odunsu bitki besi ortamı (OBO,

George ve Sherrington 1984), 5) Gamborg besi ortamı (B5, George ve Sherrington 1984). Ayrıca elde edilen kallus yapılarından somatik embriyo gelişimini arttırmak üzere embriyo çimlendirme ortamı (GM, Fiore ve ark. 1997), elde edilen embriyogenik ve organogenik dokuların gelişimini arttırmak üzere sürgün geliştirme ortamı (VM, Fiore ve ark. 1997), gelişmiş sürgünlerden kök gelişimini başlatmak ve geliştirmek için, köklendirme ortamı (RA2, Trabace ve ark. 1995) regenerasyon çalışmaları boyunca kullanılmıştır. Besi ortamlarına karbon kaynağı olarak sukroz (Merck) % 3 ve köklendirme ortamına (RA2) ise % 1 oranında ilave edilmiştir (Murashige ve Skoog 1962, George ve Sherrington 1984, Wilcox ve Cooley 1987, Trabace ve ark. 1995, Fiore ve ark. 1997). Besi ortamlarının pH'sı 5.7-5.8'e ayarlanıp % 0.8 (½ MS ortamı için % 0.5 oranında) agar (Merck) ilave edildikten sonra 121 °C sıcaklıkta 15 lb (0.454 kg) basınca sahip otoklavda 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Bu şekilde sterilizasyonu tamamlanan besi ortamları su banyosu içerisinde 50-55 °C el değecek sıcaklığa gelene kadar bırakılmış ve daha önceden steril edilmiş petri kaplarına (15 x 90 mm) her bir petriye yaklaşık olarak 20-25 ml gelecek şekilde boşaltılmıştır. Petri kaplarının içerisinde soğuyarak yarı katı jelimsi bir yapıya sahip olan besi ortamları steril koşullarda muhafaza edilmiştir.

Tez çalışması boyunca laboratuvar denemelerinde çok sayıda besi ortamının hazırlanması ve birim hacimde bulunan makro ve mikro elementlerin, büyüme düzenleyicilerinin ve vitaminlerin oranlarının düşük olmasından dolayı bu maddelerin teker teker tartılarak hazırlanması aşamasının büyük zaman kaybı ve hassasiyet gerektirmesi nedeniyle besi ortamını oluşturan bu öğelerin stok solüsyonları hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarının içerikleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

3.5.1.1. Makro ve mikro elementlerin stok solüsyonlarının hazırlanması

Makro elementler (NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) litrede bulunması gereken oranların 10 katı kadar hassas terazide tartıldıktan sonra, içerisinde 200 ml saf su bulunan ve bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 1 litrelik beher içerisine sırası ile ilave edilmişlerdir. Karışımı oluşturan elementler iyice çözüldükten sonra karışımın hacmi 1 litreye tamamlanmış ve 1 litrelik kahverengi şişeye yerleştirilmiştir. Şişenin üzerine yapıştırılan etiketlere besi

ortamının yapılış tarihi ve yapan kişinin adı yazılarak buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

Mikro elementler (H_3BO_3 , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$, KI, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) litrede bulunması gerekli oranların 100 katı kadar hassas terazide tartıldıktan sonra içerisinde 200 ml saf su bulunan ve bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 1 litrelik beher içerisine sırası ile ilave edilmiştir. Karışımı oluşturan elementler tamamen çözüldükten sonra karışımın hacmi 1 litreye tamamlanmış ve diğer işlemler makro elementlerin stok solüsyonu hazırlığı için yapılan işlemlerin benzeri şekilde yapılmıştır.

3.5.1.2. Jelat (Na_2 -EDTA, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) solüsyonunun hazırlanması

Her iki bileşik litrede bulunması gereken oranlarının 200 katı kadar (5.57 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 7.45 g Na_2 -EDTA) hassas terazide tartılmıştır. Magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş 1 litrelik cam beher içerisine 200 ml saf su ve Na_2 -EDTA ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcınının karıştırma sistemine ilave olarak ısıtma sistemi çalıştırılmıştır. Çözelti 90 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Çözeltinin sıcaklığı 90 °C'ye geldiğinde çözeltiliye tartılmış olan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ilave edilmiş ve çözelti tamamen çözüne kadar karıştırılmıştır. Solüsyon altın sarısı bir renk almıştır. Çözünme işlemi bittikten sonra çözelti soğumaya bırakılmıştır. Çözeltinin sıcaklığı oda sıcaklığına düştüğünde hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanmış olan jelat solüsyonu koyu renkli bir cam şişe içerisine aktarılmış ve üzerine etiket [(stok çözelti adı, hazırlama tarihi ve konsantrasyonu (X 200 Demir stok solüsyonu)] yazıldıktan sonra buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.5.1.3. Vitamin stok solüsyonlarının hazırlanması

Her bir besi ortamı için gerekli olan vitaminler ayrı ayrı stok solüsyonlar halinde hazırlanarak buzdolabında (+4 °C) kahverengi şişeler içerisinde muhafazaya alınmışlardır. Nikotinik asit, Tiamin HCl, Pirodoksın-HCl, mio-İnositol ve Glisin'nin Çizelge 3.3.'de verilen oranlarının 100 katı mg düzeyinde hassas terazide tartılarak 20-30 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml ye tamamlanmış (100 mg/100 ml) ve kahverengi cam şişeler içerisinde üzerlerine etiketler yazılarak buzdolabında muhafaza edilmişlerdir.

3.5.1.4. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonlarının hazırlanması

Besi ortamları için gerekli olan GA₃ (giberellik asit), NAA (naftalin asetik asit) ve 6-BAP'ın (6 benzil amino pürin) stok solüsyonu ayrı ayrı hazırlanmıştır. Her bir büyüme düzenleyicisinden 100 mg hassas terazide tartılarak birkaç damla 1 N NaOH ve/veya EtOH gibi çözücüler içerisinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve kahverengi cam şişelere yerleştirildikten sonra üzerlerine etiketler yazılarak (örn. 100 mg/ 100 ml BAP) buzdolabında muhafazaya alınmıştır.

3.5.1.5. Stok solüsyonlardan yararlanılarak tohum çimlendirme besi ortamının hazırlanması (1/2 MS)

Denemelerde kullanılacak olan eksplant kaynaklarının temin edilmesi için steril edilen ayçiçeği tohumları ½ Murashige ve Skoog (1962) besi ortamında çimlendirilerek gelişmeleri sağlanmıştır. Çimlendirme ortamında kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.3'te verilmiştir. Besi ortamının hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

50 ml makro ve 5 ml mikro element stok solüsyonu magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan 1 litrelik beher kabına boşaltılarak iyice karıştırılmıştır. Buna 400 ml saf su, 2.5 ml demir jelat, 0.5 ml vitamin solüsyonu ½ MS ortamı için hazırlanmış olan stok solüsyonlarından ilave edilmiştir. Daha sonra sukroz karbon kaynağından % 1.5 hesabı ile besi ortamına ilave edilerek saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH metre aracılığı ile ortamın pH'sı 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. pH ayarlanmasında 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltilerinden yararlanılmıştır. Otoklav edilebilen mavi kapaklı şişelere boşaltıldıktan sonra her besi ortamı için % 0.5 olacak şekilde Merck agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamı 121 °C'de 15 atmosfer basınca ayarlanmış otoklavda 20 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavdan alınan steril besi ortamları saf su banyosunda belli bir süre bekletilmiştir. El değecek sıcaklığa (50-55 °C) ulaşıncaya steril petri kaplarına steril kabin içerisinde dökülmüştür.

Çizelge 3.3. Stok solüsyonlar kullanılarak 1/2 MS yapay besi ortamının hazırlanması

Makro Elementler Stok Solüsyonu	mg/l	(X10) mg/l	(g/l) 1 litre suya hazırlanıyor	$\frac{1}{2}$ MS Ortamı Hazırlama (1 L)
NH ₄ NO ₃	1650	16500	16.5	50 ml alınır 400 ml saf suda çözülür
KNO ₃	1900	19000	19.0	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	4400	4.4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3700	3.7	
KH ₂ PO ₄	170	1700	1.7	
Mikro Elementler Stok Solüsyonu	mg/l	(X100) mg/l	(g/l) 1 litre suya hazırlanıyor	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	2230	2.23	5 ml alınır
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	860	0.86	
H ₃ BO ₃	6.2	620	0.62	
KI	0.83	83	0.083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	25	0.025	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	2.5	0.0025	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	2.5	0.0025	
Demir Stok Solüsyonu	mg/l	(X200) mg/l	(g/l) 1 litre suya hazırlanıyor	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	5570	5.57	2.5 ml alınır
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (Titriplex)	37.3	7450	7.45	
Vitamin Stok Solüsyonu	mg/l	(X100) mg/l	(g/l) 100 ml suya hazırlanıyor	
Glisin	2.0	200	0.2	0.5 ml alınır
Nikotik asit	0.5	50	0.05	
Pyridoksin. HCl	0.5	50	0.05	
Tiamin. HCl	0.1	0	0.01	
Mio inositol	100	10000	10	
Sakkaroz			30	Sakkaroz ilave edilir
				1000 ml ye saf su ile tamamlanır
pH			5.7-5.8	pH ölçülür
Agar			7.0-8.0	Şişelere agar aktarılır
				Otoklav ile sterilizasyon
				Su banyosunda ılıtılır 50- 55 °C
				Petri kaplarına dağıtılır

3.5.1.6. Embriyo indüksiyon ortamının hazırlanması (EİO ve EİO-A)

Embriyo indüksiyon ortamı Fiore ve ark. (1997) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir. EİO-A hazırlanırken EİO'dan farklı olarak GA₃ büyüme düzenleyicisi besi ortamına % 1 oranında ilave edilmiştir. Besi ortamının hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

100 ml makro ve 10 ml mikro element stok solüsyonu magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan 1 litrelik behere boşaltılarak iyice karıştırılmıştır. Buna 300 ml saf su, 5 ml demir jelat, 1 ml vitamin solüsyonu MS ortamı için hazırlanmış olan stok solüsyonlarından ilave edilmiştir (Şekil 3.3. a). Hassas terazide 5 g/L KNO₃ (Carlo Erba), 0.5 g/L kasein hidrolizat (Sigma), sukroz karbon kaynağından 30 g/L (Sigma) tartılarak magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan behere ilave edilmiştir. Önceden hazırlanmış GA₃ stoğundan 1 ml/L, BA stoğundan 1 ml/L ve NAA stoğundan 1 ml/L 1 ml'lik cam pipetlerle behere ilave edilmiştir. Daha sonra 545.5 ml saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH metre aracılığı ile ortamın pH'sı 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. pH ayarlanmasında 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltilerinden yararlanılmıştır (Şekil 3.3. b). Otoklav edilebilen mavi kapaklı şişelere boşaltıldıktan sonra her besi ortamı için 8 g/L olacak şekilde Merck agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamı 121 °C'de 15 atmosfer basınca ayarlanmış otoklavda 20 dakika sterilize edilmiştir (Şekil 3.3.c). Otoklavdan alınan steril besi ortamları saf su banyosunda belli bir süre bekletilmiştir (Şekil 3.3.d). El değecek sıcaklığa (50-55 °C) ulaşıncaya steril petri kaplarına steril kabin içerisinde dökülmüştür (Şekil 3.3.e,f). Aşağıda anlatılan tüm besi ortamlarının hazırlanmasında bu yöntem izlenilmiştir.

3.5.1.7. Modifiye White besi ortamının hazırlanması (MWO)

Modifiye White besi ortamı Wilcox ve Cooley (1987) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ayçiçeği *in vitro* regenerasyon denemelerinde kullanılan besi ortamları (mg/L)

Makro Elementler	MS	EİO	MWO	ABO	OBO	B5	GM	VM	RA2
NH₄NO₃	1650	1650	400	2000	400	-	1650	825	825
KNO₃	1900	5000	80	950	-	2500	5000	950	950
CaCl₂.2H₂O	440	440	-	440	96	150	440	220	220
MgSO₄.7H₂O	370	370	7.2	370	370	250	370	185	185
KH₂PO₄	170	170	12.5	170	170	-	170	85	85
Na₂-EDTA	37.26	37.26	25	37.26	37.3	24.7	37.26	1.9	1.9
FeSO₄.7H₂O	27.8	27.8	-	27.8	27.8	-	27.8	1.4	1.4
KCl	-	-	65	-	-	-	-	-	-
Ca(NO₃)₂.H₂O	-	-	144	-	429	-	-	-	-
NaH₂PO₄.H₂O	-	-	-	170	-	150	-	-	-
K₂SO₄	-	-	-	-	990	-	-	-	-
(NH₄)₂SO₄	-	-	-	-	-	134	-	-	-
Mikro Elementler									
H₃BO₃	6.2	6.2	1.6	6.2	6.2	3	6.2	3.1	3.1
MnSO₄.4H₂O	22.3	22.3	6.5	22.3	29	13	22.3	11.15	11.15
ZnSO₄.4H₂O	8.6	8.6	3.9	8.6	7	1.6	8.6	4.3	4.3
KI	0.83	0.83	-	0.83	-	0.75	0.83	0.415	0.415
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25	0.25	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125
CuSO₄.5H₂O	0.025	0.025	-	0.025	0.25	0.025	0.025	0.0125	0.0125
CoCl₂.6H₂O	0.025	0.025	-	0.025	-	0.025	0.025	0.0125	0.0125
Organik Bileşikler									
Sukroz	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	10000
Glisin	2	-	2	-	2	-	-	37.5	-
Vitaminler									
mio-inositol	100	100	100	100	100	100	100	-	50
nikotinic asit	0.5	-	0.5	-	0.5	1	-	-	-
pirodoksin-HCl	0.5	-	0.5	-	0.5	1	-	-	-
tiamin-HCl	0.1	-	0.2	0.4	1	10	-	-	0.05
L-glutamin	-	-	-	-	-	-	-	439	-
L-aspartik asit	-	-	-	-	-	-	-	133	-
L-arginin	-	-	-	-	-	-	-	144	-
NAA		1	1	1	1	1	0.5	-	0.1
6-BAP		1	1	1	1	1	1	-	-
GA₃		0.1	1	1	1	1	0.1	0.2	-
Agar	10000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
pH (Ayarlanmış pH)	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8

3.5.1.8. Anderson besi ortamının hazırlanması (ABO)

Anderson besi ortamı George ve Sherrington (1984)'ın kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

3.5.1.9. Odunsu bitki besi ortamının hazırlanması (OBO)

Odunsu bitki besi ortamı George ve Sherrington (1984) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

3.5.1.10. Gamborg besi ortamının hazırlanması (B5)

Gamborg besi ortamı George ve Sherrington (1984) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

3.5.1.11. Sürgün geliştirme besi ortamının hazırlanması (VM)

Sürgün geliştirme besi ortamı Fiore ve ark.'nın (1997) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

3.5.1.12. Köklendirme besi ortamının hazırlanması (RA2)

Köklendirme besi ortamı Fiore ve ark. (1997) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

3.5.1.13 Embriyo çimlendirme besi ortamının hazırlanması (GM)

Embriyo çimlendirme besi ortamı Fiore ve ark. (1997) kullandığı biçimde hazırlanmış olup kullanılan makro ve mikro elementler, vitamin ve organik bileşikler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

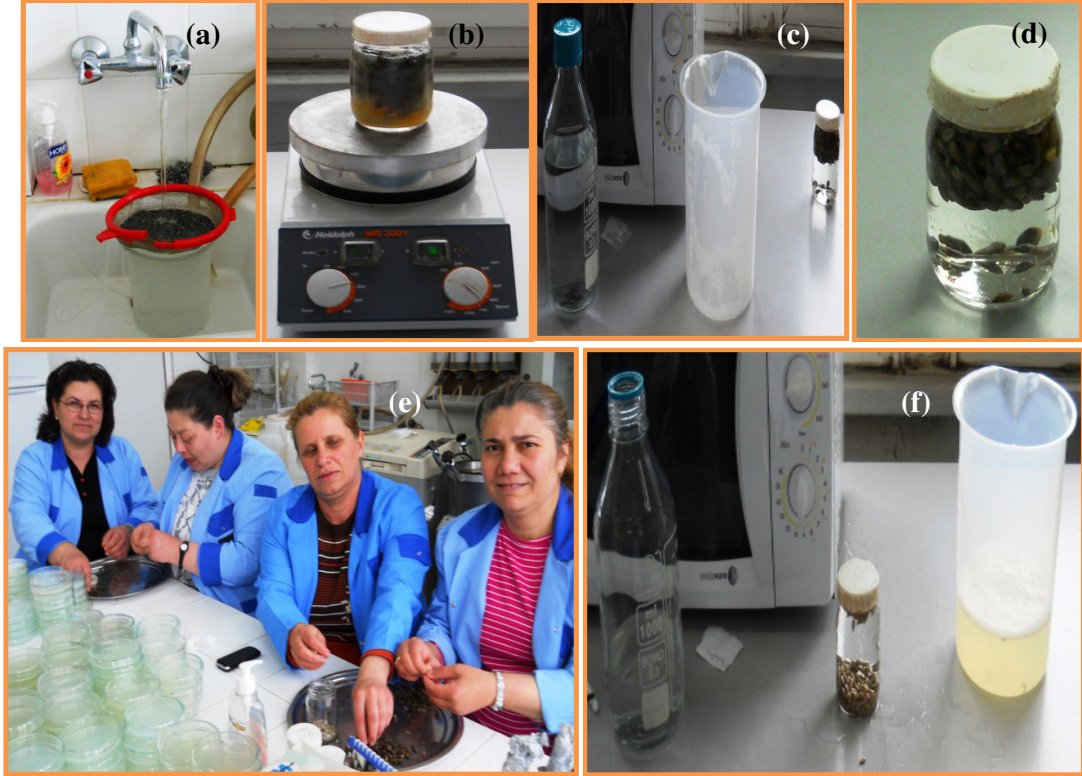


Şekil 3.3. Besi ortamlarının hazırlanması, (a) Isıtıcı karıştırıcı üzerinde besli ortamlarının hazırlanması, (b) pH metre ile ortam pH'sının 5.7'ye ayarlanması, (c) Besli ortamlarının otoklavda sterilizasyonu (d) Besli ortamlarının 50 °C sıcaklıkta su banyosunda 2-3 saat bırakılması, (e) Besli ortamlarının petri kaplarına aktarılması (f) Petri kaplarına aktarılmış denemede hemen kullanılacak olan besli ortamları

3.5.2. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve ayçiçeği eksplantlarının besli ortamına bırakılması

Denemede kullanılan genotiplerin tohumları ilk olarak ½ saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak (Şekil 3.4.a), arazi şartlarından kaynaklı bulaşma etkenlerinin oranı azaltılmıştır. Daha sonra, tüm tohumlar, 2 dakika % 70 alkolle (Dağüstü 1999) çalkalanmıştır. Farklı konsantrasyon (% 10, 20, 30, 40, 60, 90) ve sürelerde (10, 20, 40 dk.) steril edilen tohumlar (Şekil 3.4.b), deterjanın etkisini uzaklaştırmak amacıyla steril suyla 5-6 kez çalkalanarak temizlenmiştir (Şekil 3.4.c). Ayçiçeği kabuklarının soyularak

besi ortamında çimlendirilmesi denemesinde kullanılmak üzere tohum kabuklarının kolay soyulması için bir saat steril saf suda bekletilmiştir (Şekil 3.4.d). Kabukları elle soyulan tohumlar (Şekil 3.4.e) daha sonra % 3 NaOCl+1 damla deterjanda 5 dak. süreyle dezenfekte edilmiş ve steril saf suyla 5-6 kez çalkalanarak (Şekil 3.4.f) ikinci kez yüzey sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Ayçiçeği tohumlarının yüzey sterilizasyonu, (a) Ayçiçeği genotiplerinin ½ saat su altında yıkanması, (b) Isıtıcı karıştırıcı üzerinde steril edilen tohumlar, (c) Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların steril saf suyla çalkalanması, (d) Ayçiçeği genotiplerinin 1 saat steril saf suda bekletilmesi, (e) Tohum kabuklarının elle soyulması, (f) İkinci kez yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların steril saf suyla çalkalanması.



Şekil 3.5. Ayçiçeği genotiplerinden eksplant kaynaklarının elde edilmesi (a) ½ MS besi ortamında çimlendirilerek geliştirilen ayçiçeği bitkiciklerinden hipokotil ve kotiledon eksplantlarının eldesi, (b) EİO'na aktarılmış kotiledon eksplantları, (c) EİO'na aktarılmış hipokotil eksplantları (d) ayçiçeğinin olgunlaşmamış tohumlarından olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının eldesi ve EİO'na aktarılması

3.5.3. Kültüre alma koşulları (İnkübasyon)

Petriler 26 ± 1 °C'de Philips beyaz floresan ışığı altında 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodunda, nem oranı % 50 olan iklim kabininde 3 gün boyunca çimlenme amacıyla inkübe edilmiştir (Şekil 3.6). Çimlenmiş tohumlardan elde edilen eksplantların (Şekil 3.5.a) aktarıldığı regenerasyon besi ortamlarını içeren petriler (Şekil 3.5.b,c,d) yaklaşık 4 hafta süreyle tekrar iklim dolabına alınmıştır. Sürgün geliştiren eksplantların aktarıldığı sürgün geliştirme ve gelişen sürgünlerin köklendirildiği kök geliştirme ortamlarını içeren tüpler de yine iklim kabininde, bitkilerin 3-5 yapraklı döneme gelmesine kadar tutulmuştur.



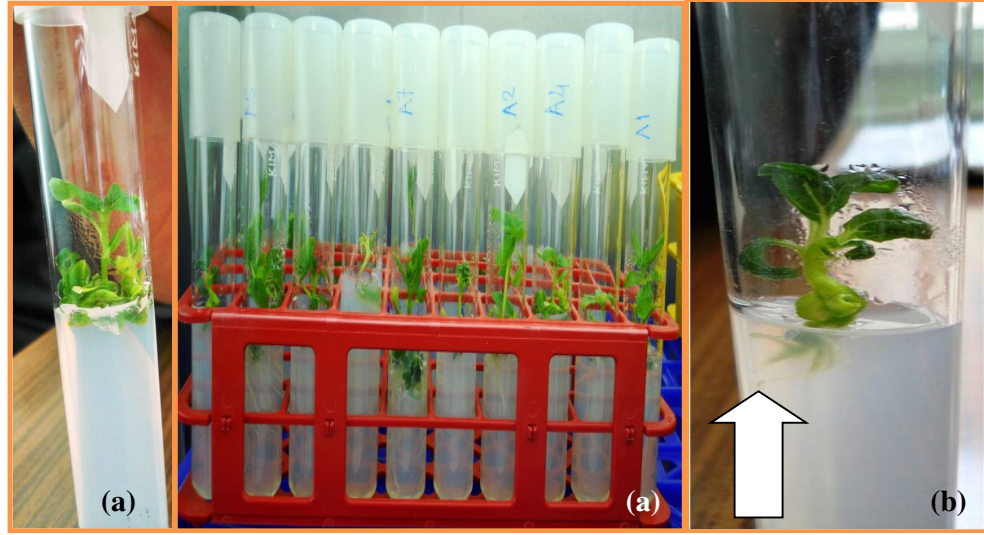
Şekil 3.6. U. Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'na ait inkübasyon odası

3.5.4. Embriyo indüksiyon ortamında gelişen kallusların embriyo çimlendirme ortamına aktarılması

Hipokotil ve kotiledon eksplantları embriyo indüksiyon ortamında (EİO) kültüre alındıktan 3-4 hafta sonra embriyogenik özellikteki kalluslar embriyo çimlendirme besi ortamına aktarılmış ve kontrollü şartlardaki iklim dolabında yukarıda belirtilen ışık, sıcaklık ve nem koşullarında 1-2 hafta süreyle inkübe edilmiştir (Fiore ve ark. 1997).

3.5.5. Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen sürgünlerin sürgün geliştirme besi ortamlarına aktarılması

Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından regenere olan sürgünler, çoğaltma ve geliştirme amacıyla sürgün geliştirme besi ortamına (VM) aktarılmıştır ve 1-2 hafta süreyle yukarıda belirtilen ışık, sıcaklık ve nem koşullarında inkübe edilmiştir (Fiore ve ark. 1997).



Şekil 3.7. Ayçiçeğinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarından organogenesisle elde edilen sürgünlerden VM ve RA2 besi ortamlarında bitkicik oluşturulması (a) VM besi ortamında büyütüp çoğaltılan sürgünler, (b) RA2 besi ortamında köklendirilmiş gelişmiş sürgünler

Sürgünlerin daha iyi gelişebilmeleri için içerisinde VM ortamı bulunan (25 ml) 20 x 150 mm deney tüplerine aktarılmış (Şekil 3.7.a) ve gelişmeleri için kontrollü şartlardaki iklim dolabında inkübe edilmiştir.

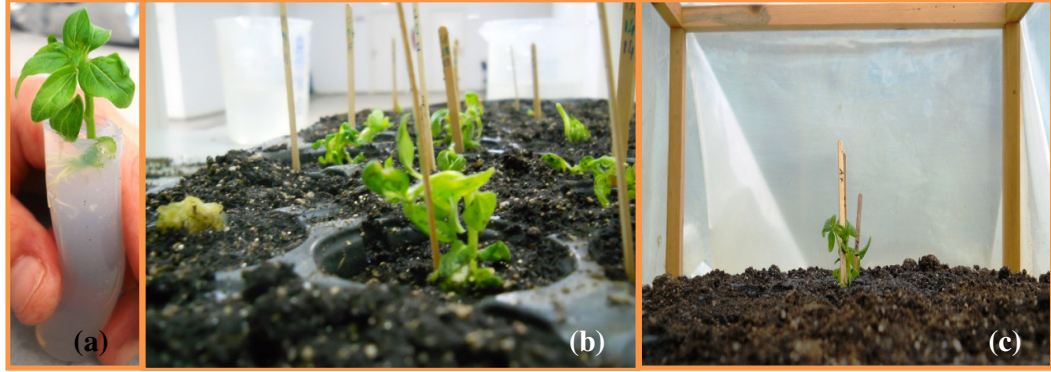
3.5.6. Gelişen sürgünlerin kök geliştirme ortamlarına aktarılması

Sürgün geliştirme ortamlarında büyütülen sürgünler, köklendirilmek amacıyla içinde köklendirme besi ortamı bulunan (RA2) (25 ml) 20 x 150 mm deney tüplerine aktarılmış (Şekil 3.7.b) ve yukarıda belirtilen ışık, sıcaklık ve nem koşullarında 1-2 hafta süreyle kontrollü şartlardaki iklim dolabında inkübe edilmiştir (Fiore ve ark. 1997).

3.5.7. Bitkiciklerin dış ortama aktarılması (Aklimatizasyon)

Toprak üstü ve toprak altı aksamı iyi gelişen bitkicikler (~3-5 cm uzunlukta sürgün, dallı iyi gelişmiş köke sahip) (Şekil 3.8.a) steril su içerisinde yıkanarak köklerindeki agarlar temizlenmiştir ve 31x51 cm boyutlarındaki içerisinde 48 tane küçük bölmenin yer aldığı ve otoklavda steril edilen 1:1:2 oranında pit:perlit:toprak karışımı içeren plastik viole aktarılmıştır (Şekil 3.8.b). Yaklaşık 3-5 gün violün üzeri plastik naylonla örtülmüştür (Şekil 3.8.c), naylon içerisinde kalan bitkiciklerin doğal havaya alıştırmaları

için yavaş yavaş naylon açılmıştır. Bitkicikler nemsiz kalmasın diye gün aşırı steril su ile sulanmıştır. Violdeki bitkiciklerin aklimatizasyonu, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait kontrolsüz sera koşullarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Regenere olan ayçiçeği bitkiciklerinin dış ortama aktarılması (a) regenere olan bitkicik, (b) viole aktarılmış bitkicikler, (c) üzeri naylonla kapatılmış viol

3.5.8. Bitkilerin toprağa şaşırtılması

Yaklaşık 1-2 hafta sonunda gelişen genç bitkiler Osmangazi Belediyesi Park Bahçeler Müdürlüğü'nden temin edilen toprak karışımını içeren 32x27 cm çapındaki (yaklaşık 16 L toprak alan) saksılara (4 bitki/saksı) aktarılmıştır. Saksılara aktarıldıktan sonra bitkilere 1.37 desicimens elektriksel iletkenlik elde edilen 20-20-20 (N-P-K) gübresinden saksı başına 130 ml (plastik su bardağı) olacak şekilde haftada 1 kez sulama suyu ile birlikte verilmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Viollerde gelişen bitkilerin saksılara şaşırtılarak doğal şartlarda yetiştirilmesi

3.5.9. *In vitro* koşullarda yürütülen gözlem ve ölçümler

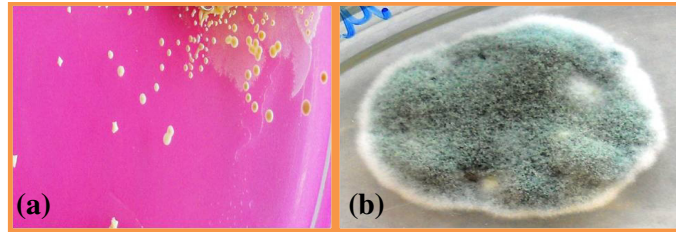
İnkübasyondan yaklaşık 3-4 gün sonra petri kaplarında gerek çıplak gözle gerekse mikroskop altında şu değerlerin ölçüm ve gözlemleri yapılmış ve veriler aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1) Çimlenme Oranı: Her petri kutusunda çimlenen tohum sayısı saptanmış ve tekerrürdeki tohumların toplam tohum sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

$$\text{Çimlenme Oranı (\%)} = (\text{Çimlenen Tohum Sayısı} / \text{Tekerrürdeki Toplam Tohum Sayısı}) \times 100$$

2) Bulaşma Oranı: Her petri kutusunda enfeksiyon bulaşmış tohum sayısı saptanmış ve tekerrürdeki tohumların toplam tohum sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 3.10.).

$$\text{Bulaşma Oranı (\%)} = (\text{Bulaşma Olan Tohum Sayısı} / \text{Tekerrürdeki Toplam Tohum Sayısı}) \times 100$$



Şekil 3.10. Besi ortamlarında gözlenen bulaşma çeşitleri (a) bakteri enfeksiyonu, (b) mantar enfeksiyonu

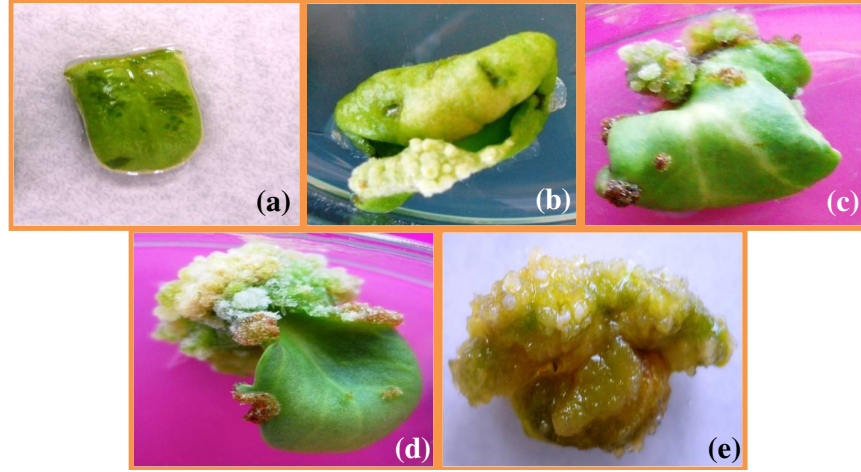
Yaklaşık 1 ay inkübasyon süresince haftada 1 kez olmak üzere petri kaplarında mikroskop altında şu değerlerin gözlemleri yapılmış ve veriler aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

3) Kallus Oluşturma Oranı: Her petri kutusunda kallus oluşturan eksplantların skor sistemine göre kallus gelişim durumu saptanmış ve tekerrürdeki eksplantların toplam sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 3.11, Şekil 3.12.).

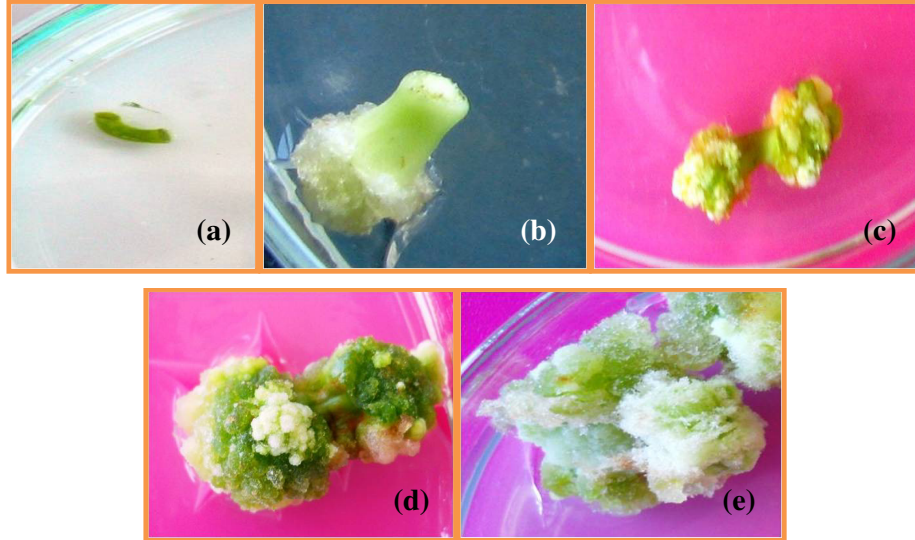
$$\text{Kallus Oluşturma Oranı (skor)} = (\text{Toplam Kallus Gelişim Durumu} / \text{Tekerrürdeki Toplam Eksplant Sayısı}) \times 100$$

Araştırmada kallus oluşturma oranı skor sistemi ile belirlenmiştir.

- 0 : Eksplant kallus oluşturmamış
1 : Eksplantın 1/4 'ü kallus oluşturmuş
2 : Eksplantın 2/4'ü kallus oluşturmuş
3 : Eksplantın 3/4'ü kallus oluşturmuş
4 : Eksplantın 4/4'ü (tamamı) kallus oluşturmuş (Dağüstü ve ark. 1998).



Şekil 3.11. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen kotiledon eksplant kaynağında skor sistemine göre kallus oluşturma değerleri (a) 0 skor, (b) 1 skor, (c) 2 skor, (d) 3 skor, (e) 4 skor



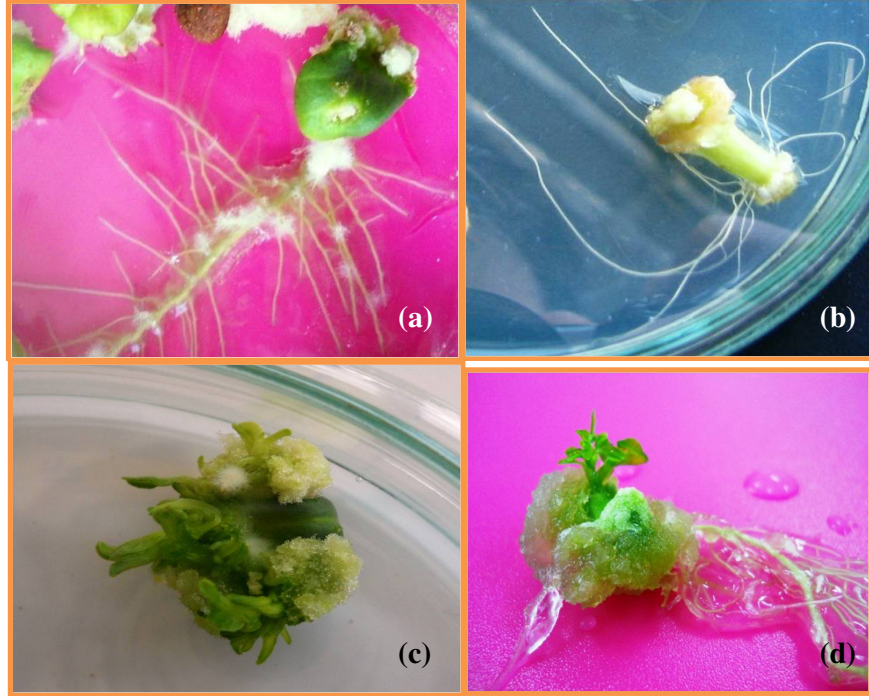
Şekil 3.12. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen hipokotil eksplant kaynağında skor sistemine göre kallus oluşturma değerleri (a) 0 skor, (b) 1 skor, (c) 2 skor, (d) 3 skor, (e) 4 skor

4) Sürgün Oluşturma Oranı: Her petri kutusunda sürgün oluşturan eksplantlar saptanmış ve tekerrürdeki eksplantların toplam sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 3.13).
Sürgün Oluşturma Oranı (%) = (Sürgün Oluşturan Eksplant Sayısı/ Tekerrürdeki Toplam Eksplant Sayısı) X 100



Şekil 3.13. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında sürgün oluşumu (a) kotiledon eksplant kaynağında sürgün oluşumu, (b) hipokotil eksplant kaynağında sürgün oluşumu

5) Kök Oluşturma Oranı: Her petri kutusunda kök oluşturan eksplantlar saptanmış ve tekerrürdeki eksplantların toplam sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 3.14.).
Kök Oluşturma Oranı (%) = (Kök Oluşturan Eksplant Sayısı / Tekerrürdeki Toplam Eksplant Sayısı) X 100



Şekil 3.14. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında kök oluşumu (a) kotiledon eksplant kaynağında kök oluşumu, (b) hipokotil eksplant kaynağında kök oluşumu, (c) kotiledon eksplant kaynağında hem kök hem de sürgün oluşumu, (d) hipokotil eksplant kaynağında hem kök hem de sürgün oluşumu

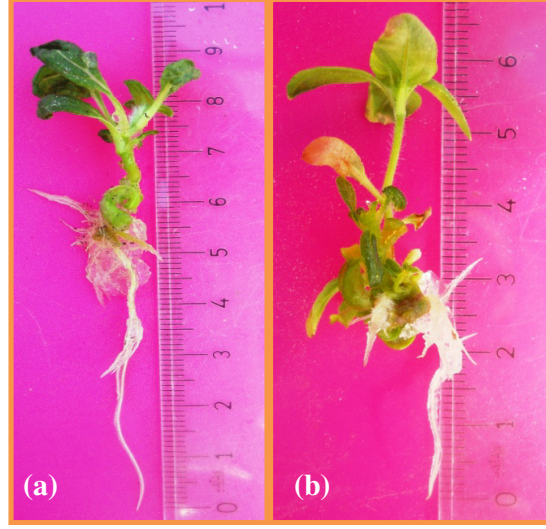
6) Embriyo Benzeri Yapı (EBY) Oluşturma oranı: Her petri kutusunda eby oluşturan eksplantlar saptanmış ve tekerrürdeki eksplantların toplam sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Embriyogenik yapı oluşumu yalnızca mikroskop aracılığıyla eksplant kaynaklarında oluşan kallus yapılarının üzerlerinde gözlenmiştir.

EBY Oluşturma Oranı = $(\text{EBY Oluşturan Eksplant Sayısı} / \text{Tekerrürdeki Toplam Eksplant Sayısı}) \times 100$

7) Bitkicik Oluşturma Oranı: Her petri kutusunda bitkicik oluşturan eksplantlar saptanmış ve tekerrürdeki eksplantların toplam sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 3.15.).

Bitkicik Oluşturma Oranı (%) = $(\text{Bitkicik Oluşturan Eksplant Sayısı} / \text{Tekerrürdeki Toplam Eksplant Sayısı}) \times 100$

formülleri kullanılmış ve ham veriler oransal olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.15. Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından elde edilen eksplant kaynaklarında bitkicik oluşumu (a) hipokotil eksplant kaynağında bitkicik oluşumu, (b) kotiledon eksplant kaynağında bitkicik oluşumu

3.5.10. Verilerin değerlendirilmesi

Araştırmada kurulan denemeler, “Tesadüf Parselleri Deneme Desenine” göre her tekrürde denemelere göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle 5 hipokotil ve 10 kotiledon eksplantı olacak şekilde 3-4 tekrarlamalı olarak kurulmuştur. Elde edilen veriler ‘JUMP-7’ bilgisayar paket programı kullanılarak “Tesadüf Parselleri Deneme Desenine” göre varyans analizlerine tabi tutulmuştur. Önemlilik testlerinde % 1 ve % 5, farklı gruplarının belirlenmesinde ise % 5 olasılık düzeyi kullanılmıştır. İstatistiki farklı gruplarının belirlenmesinde Asgari Önemli Farklılık (AÖF-LSD) testinden yararlanılmıştır.

Varyans analizi sonuçlarına göre ele alınan regenerasyon parametrelerinde varyasyon katsayı değerleri yüksek çıkan ($CV \geq 15$) parametrelerde veriler; minimum, maksimum ve ortalama değerleri olarak \pm standart hata değerleri ile birlikte verilmiştir.

3.5.10.1. Ayçiçeği bitkisinde *in vitro* sterilizasyon optimizasyonu

Çimlenme ve bulaşma oranı ile ilgili gözlemler, çimlendirme ortamına tohumlar bırakıldıktan sonra üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde yapılmıştır ve ayrı ayrı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Her petri kabı 1 tekrür kabul edilmiştir. Deneme her tekrürde 10 eksplant olacak şekilde 4 tekrürlü olarak yürütülmüştür.

3.5.10.1.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği genotiplerinde *in vitro* sterilizasyon optimizasyonu

Birinci denemede, ayçiçeği bitkisinde bitki doku kültürü çalışmalarının başarılı olarak uygulanabilmesi için sterilizasyonun eksplant alımına imkan verecek şekilde optimum hale getirilmesi amacıyla üç farklı ayçiçeği genotipinin olgunlaşmış tohumlarına (T0910182-3, T0910285-1, T0910131-1), üç farklı NaOCl konsantrasyonu (% 10, 20, 40) ve üç farklı süre (10, 20 ve 40 dakika) uygulanarak, bu muamelelerin, bulaşma ve çimlenme oranı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Çimlenme ve bulaşma oranı ile ilgili gözlemler, çimlendirme ortamına tohumlar bırakıldıktan sonra üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde yapılmış olup ayrı ayrı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.5.10.1.2. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği genotiplerinde *in vitro* sterilizasyon optimizasyonu

İkinci denemede, tohum sterilizasyonunun optimum hale getirilmesi çalışmalarına devam edilerek, üç farklı ayçiçeği genotipinin olgunlaşmış tohumlarına (T0910182-3, T0910285-1, T0910131-1), altı farklı NaOCl konsantrasyonu (% 10, 20, 30, 40, 60, 90) ve üç farklı süre (10, 20 ve 40 dakika) uygulanarak, bu muamelelerin, bulaşma ve çimlenme oranı üzerine olan etkileri incelenmiştir. İlk denemeden farklı olarak tohumlar, kabukları soyulduktan sonra % 3 NaOCl+1 damla deterjanla beş dakika süre ile steril edilmiş ve 5-7 kez steril saf suyla çalkalandıktan sonra ½ MS çimlendirme ortamına aktarılmıştır. Çimlenme ve bulaşma oranı ile ilgili gözlemler, çimlendirme ortamına tohumlar bırakıldıktan sonra üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde yapılmış olup ayrı ayrı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.5.10.2. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve embriyo indüksiyon ortamında kalma süresinin *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, ayçiçeği bitkisinin 10 farklı genotipi (T0910182-2, T0910792-1, T0910817-1, T0910950-2, T0911033-2, T0910791-1, T0910791-4, T0910930-2, T0910285-1, T0910791-3) ½ MS ortamında çimlendirilmiş ve 4 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen farklı eksplant kaynakları (hipokotil, kotiledon), EİO

ortamında, organogenesis ve somatik embriyogenesis elde etmek amacıyla kültüre alınmıştır. Bu çalışmada, farklı genotip ve eksplant kaynaklarının ayçiçeği bitkisinde organogenesis ve somatik embriyogenesis üzerine etkisi incelenmiştir.

Sterilizasyon denemeleri sonucunda, en iyi sterilizasyon sonucu olarak % 30 NaOCl konsantrasyonu + 40 dakika uygulaması verdiği için, tüm denemelerde ele alınan genotiplerin olgunlaşmış tohumları bu uygulamaya tabi tutulmuştur. Bir haftalık aralarla yapılan 4 gözlemede, kallus, sürgün, kök ve embriyo benzeri yapı oluşturma oranları gözlenmiştir.

Araştırma, her tekerrürde 10 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Gözlem sonuçları, 3 faktörlü tesadüf parselleri deneme desenine göre (eksplant x gözlem zamanı x genotip) varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.3. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, gözlem zamanı ve olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, tozlanmadan 10 gün sonra hasat edilen T0910241-3 ve RHA 16 genotiplerine ait olgunlaşmamış embriyolar, yukarıda tanımlanan EİO ortamında organogenesis ve somatik embriyogenesis elde etmek amacıyla kültüre alınmıştır. Bir hafta aralıklarla yapılan üç gözlemede, kallus oluşturma yüzdesi, organogenesis (sürgün ve kök oluşturup oluşturmadığı) ve embriyogenesis (somatik embriyo ve/veya somatik embriyo benzer yapıların üretilmesi) değerleri gözlemlenmiştir.

Denemeden elde edilen veriler iki faktörlü (genotip x gözlem zamanı) tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.4. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve NAA/BA konsantrasyonlarının *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, iki ticari hibrid ayçiçeği tohumlarının (Pactol ve Sirena), hipokotil ve kotiledon eksplantları, 16 farklı kombinasyonda BA ve NAA içeren EİO ortamına aktarılarak, kallus, kök, sürgün, eby ve bitkicik oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Kotiledon ve hipokotil eksplantları, ½ MS ortamında 3 günlük çimlendirilmiş tohumlardan sağlanmıştır.

Hazırlanan EİO ortamı, % 0.5 KNO₃, % 0.1 Gibberelik asit (GA₃) ve % 0.05 kasein hidrolizat, % 3 sukroz içeren MS (1962) besi ortamından hazırlanmış olup 16 farklı kombinasyonda BA ve NAA hormonlarını içermektedir.

EİO ortamına ilave edilen BA ve NAA konsantrasyonları; **A:** % 0.1 BA, % 0.1 NAA; **B:** % 0.1 BA, % 0.5 NAA; **C:** % 0.1 BA, % 1.0 NAA; **D:** % 0.1 BA, % 1.5 NAA; **E:** % 0.5 BA, % 0.1 NAA; **F:** % 0.5 BA, % 0.5 NAA; **G:** % 0.5 BA, % 1.0 NAA; **H:** % 0.5 BA, % 1.5 NAA; **I:** % 1.0 BA, % 0.1 NAA; **J:** % 1.0 BA, % 0.5 NAA; **K:** % 1.0 BA, % 1.0 NAA; **L:** % 1.0 BA, % 1.5 NAA; **M:** % 1.5 BA, % 0.1 NAA; **N:** % 1.5 BA, % 0.5 NAA; **O:** % 1.5 BA, % 1.0 NAA; **P:** % 1.5 BA, % 1.5 NAA. Veriler dördüncü hafta gözlemlerinden alınmıştır.

Üç faktörlü (genotip x eksplant x EİO) tesadüf parselleri deneme desenine göre her tekerrürde 5 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

Üç faktörlü (genotip x EİO x eksplant) tesadüf parselleri deneme desenine her tekerrürde 5 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.5. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve çimlendirme sürelerinin *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, Pactol ve Sirena genotiplerine ait ayçiçeği tohumlarının, hipokotil ve kotiledon eksplantları ½ MS ortamında 5 farklı çimlendirme zamanında (1-3-5-7-9 gün) çimlendirilmiş olup, bu denemede ele alınan eksplantlar (hipokotil, kotiledon) % 0.1 NAA; % 0.1 BA içeren EİO ortamına aktarılarak, regenerasyon kapasiteleri belirlenmiştir. Deneme verileri 4. hafta yapılan gözlemlerden elde edilmiştir.

Üç faktörlü (Genotip X Eksplant X Çimlendirme Ortamında Kalma Süresi) tesadüf parselleri deneme desenine göre her tekerrürde 5 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.6. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşullarının *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, ayçiçeği bitkisinin iki hibrid (Pactol, Sirena) çeşidi, ½ MS ortamında karanlık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda çimlendirilmiştir. 3 günlük çimlenmiş

tohumlardan elde edilen farklı eksplant kaynakları (hipokotil, kotiledon), EİO (A) ortamında yine karanlık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda 2 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Bunu takiben 1 hafta tüm muamele gören petri kapları 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Daha sonra iki hafta GM ortamında 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda kültüre alınarak regenerasyon potansiyelleri belirlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplantlar 1-2 hafta süreyle VM ortamına aktarılarak, sürgünleri geliştirilmiş, sonra da RA2 köklendirme ortamında 3-4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Bitkicik oluşturan sürgünler torf içeren viole aktarılmıştır ve doğal şartlarda 4-6 yapraklı devreye kadar geliştirilmiştir. Daha sonra gelişmiş bitkiler toprağa aktarılmıştır.

Sterilizasyon denemelerinde, en iyi sterilizasyon yöntemi % 30 NaOCl konsantrasyonu + 40 dakika uygulaması seçildiği için, tüm genotiplere bu sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır.

Üç faktörlü (genotip x eksplant x aydınlanma koşulu) tesadüf parselleri deneme desenine göre her tekerrürde beş eksplant parçası olacak şekilde üç tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.7. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şeklinin *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, ayçiçeği bitkisinin iki hibrid (Pactol, Sirena) çeşidi, ½ MS ortamında 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda çimlendirilmiş ve üç günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen kotiledon eksplantlarının % 25'inin üst yüzeyi (parlak ve tüysüz) üste gelecek şekilde (düz), % 25'i iğne ucuyla 3-5 kez zedelenerek üst yüzeyi üste gelecek şekilde (düz zedeli), % 25'inin alt yüzeyi (mat) üste gelecek şekilde (ters), % 25'i iğne ucuyla 3-5 kez zedelenerek alt yüzeyi üste gelecek şekilde (ters zedeli) EİO besli ortamlarına bırakılmıştır. Mekanik zedelemenin ve yerleştirme yönünün ayçiçeği bitkisinde organogenesis ve somatik embriyogenesis üzerine etkisi incelenmiştir.

İki faktörlü (genotip x mekanik zedeleme) tesadüf parselleri deneme desenine göre her tekerrürde 5 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

3.5.10.8. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının *in vitro* regenerasyon değerleri üzerine etkisi

Bu denemede, 5 farklı EİO ortamının ayçiçeği bitkisinde organogenesis ve somatik embriyogenesis üzerine etkisini belirlemek üzere ayçiçeği bitkisinin iki hibrid (Pactol, Sirena) çeşidi, ½ MS ortamında 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda çimlendirilmiştir. 3 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen kotiledon ve hipokotil eksplantları 5 farklı EİO ortamına (ABO, MWO, B5, OBO, EİO A) aktararak, 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda kültüre alınmıştır.

Üç faktörlü (genotip x eksplant x EİO) tesadüf parselleri deneme desenine göre her tekerrürde 5 eksplant parçası olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ayçiçeği Bitkisinde *İn Vitro* Sterilizasyon Optimizasyonu

4.1.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği genotiplerinde *in vitro* sterilizasyon optimizasyonu

Varyans analizi sonuçları doğrultusunda, 3 farklı gözlem zamanında alınan çimlenme ve bulaşma oranı verileri Çizelge 4.1. de verilmiştir. NaOCl konsantrasyonu ele alınan 3 gözlem zamanında çimlenme oranını etkilemezken, süre uygulaması sadece 7. günde çimlenmeyi % 1 düzeyinde etkilemiştir. Ele alınan 3 genotipte 3., 5. ve 7. günlerde alınan çimlenme oranları bakımından genotipler arasında % 1 düzeyinde istatistiki olarak farklılıklar bulunmuştur. Konsantrasyon x süre interaksyonu 3. ve 5. günlerde % 5 düzeyinde çimlenme oranı üzerinde önemli olmuştur. Konsantrasyon x süre interaksyon uygulaması bütün gözlem tarihlerinde bulaşma oranı üzerinde istatistiki olarak önemli farklılıklar ortaya çıkarmamıştır. Konsantrasyon x genotip interaksyonu 3. ve 7. günlerde bulaşma oranı için önemli bulunmuştur. Konsantrasyon x genotip interaksyonu 3 gözlem tarihinde de çimlenme oranı bakımından önemli farklılıklar göstermez iken süre x genotip ve konsantrasyon x genotip x süre interaksyonları tüm gözlem günlerinde hem çimlenme hem de bulaşma oranı için önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında sterilizasyon optimizasyonu denemesi varyans analizi değerleri

Varyasyon Kaynağı	S. D.	3. gün (K.O.)		5.gün (K.O.)		7.gün (K.O.)	
		Ç.O.	B.O.	Ç.O.	B.O.	Ç.O.	B.O.
Konsantrasyon (K)	2	25.9	3611.1**	28.7	789.8**	239.8	237.04*
Süre (S)	2	300.9	869.4**	228.7	770.4**	1139.8**	445.37**
Genotip (G)	2	8762**	2144.4**	8381.5**	1350.9**	8123.1**	1714.81**
(K) x (S)	4	595.4*	22.2	482.9*	28.7	235.6	45.37
(K) x (G)	4	289.8	609.7**	206.5	171.8	264.8	414.81**
(S) x (G)	4	1098.1**	2305.6**	969.0**	935.6**	1131.5**	464.81**
(K) x (S) x (G)	8	159.3*	225.0*	152.3*	79.4*	204.4*	98.15*
Hata	81	220.1	138.6	221.3	121.9	225.3	78.4
Toplam	107						
CV (%)		2.65	1.79	2.56	1.45	2.42	1.07

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S.D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, Ç.O: Çimlenme Oranı, B.O: Bulaşma Oranı, K.O.: Kareler Ortalaması

Üçüncü gün gözlem sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme oranını T0910182-3 genotipi (% 79.4), 10 ve 20 dk. süre uygulamalarında (% 88.3, % 84.2), en düşük bulaşma oranı, T0910131-1 genotipinde 20 dk. süre uygulamasında (% 55) gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2.). Genotip ortalamasına bakıldığında ise, T0910182-3 ve T0910131-1 genotipleri aynı grup içinde yer alarak en düşük bulaşma oranını (% 68.6, % 67.5) göstermiştir.

Çizelge 4.2. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 3. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) Genotip x Süre Ort.	B.O. (%)	B.O. (%) Genotip x Süre Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B.O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	87.5 ab	88.3 a	80.0 b-d	59.2 cd	79.4 a	68.6 b
		20	87.5 ab		45.0 h1			
		40	90.0 a		52.5 g-1			
	20	10	92.5 a	84.2 a	90.0 ab	80.0 ab		
		20	77.5 a-e		72.5 c-e			
		40	82.5 a-c		77.5 b-d			
	40	10	60.0 d-h	65.8 b	90.0 ab	66.7 c		
		20	57.5 e-1		57.5 e-h			
		40	80.0 a-d		52.5 e-h			
T0910285-1	10	10	52.5 f-1	50.8 cd	92.5 ab	85.8 ab	49.2 c	81.4 a
		20	50.0 g-1		82.5 a-c			
		40	50.0 g-1		82.5 a-c			
	20	10	50.0 g-1	50.8 cd	85.0 a-c	80.0 ab		
		20	55.0 f-1		77.5 b-d			
		40	47.5 g-1		77.5 b-d			
	40	10	40.0 h1	45.8 d	82.5 a-c	78.3 b		
		20	47.5 g-1		82.5 a-c			
		40	50.0 g-1		70.0 c-f			
T0910131-1	10	10	47.5 g-1	50.0 cd	97.5 a	88.3 a	57.8 b	67.5 b
		20	50.0 g-1		97.5 a			
		40	52.5 f-1		70.0 c-f			
	20	10	72.5 a-f	58.3 bc	70.0 c-f	55.0 d		
		20	65.0 c-g		55.0 f-1			
		40	37.5 1		40.0 1			
	40	10	65.0 c-g	65.0 b	65.0 d-g	59.2 cd		
		20	62.5 c-g		57.5 e-h			
		40	67.5 b-g		55.0 f-1			

Ort.: Ortalama, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, Kon.: Konsantrasyonu

Beşinci gün gözlem sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme oranı T0910182-3 genotipinde, 10 ve 20 dk. süre uygulamalarında (% 90.8, % 84.2) gözlemlenirken, en düşük bulaşma oranı, T0910131-1 genotipinde 20 dk. süre uygulamasında (% 65.8) gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3.). Genotip ortalamasına bakıldığında ise, T0910182-3

genotipi en yüksek çimlenme oranı (% 81.4) ve bulaşma oranı (% 86.1) verirken T0910131-1 genotipi en düşük bulaşma oranını (% 77.8) vermiştir.

Yedinci gün gözlem sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme oranı T0910182-3 genotipinde, 10 ve 20 dk. süre uygulamalarında (% 94.2, % 90.0) gözlemlenirken, en düşük bulaşma oranı, T0910131-1 genotipinde, 20 dk. ve 40 dk. süre uygulamalarında (% 75.8, % 80.0) gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4.). Genotip ortalamalarına bakıldığında ise, T0910182-3 genotipi en yüksek çimlenme oranını verirken (% 85.8), T0910131-1 genotipi en düşük bulaşma oranını (% 83.9) vermiştir.

Çizelge 4.3. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 5. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) Genotip x Süre Ort.	B. O. (%)	B. O. (%) Genotip x Süre Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B. O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	87.5 ab	90.8 a	85.0 a-e	82.5 bc	81.4 a	86.1 a
		20	90.0 a		87.5 a-e			
		40	95.0 a		75.0 d-f			
	20	10	92.5 a	84.2 a	90.0 a-d	87.5 ab		
		20	77.5 a-d		92.5 a-c			
		40	82.5 a-c		80.0 c-f			
	40	10	60.0 d-g	69.2 b	97.5 ab	88.33 ab		
		20	65.0 c-g		85.0 a-e			
		40	82.5 a-c		82.5 b-f			
T0910285-1	10	10	52.5 fg	51.7 d	97.5 ab	93.33 a	51.9 c	89.7 a
		20	50.0 fg		92.5 a-c			
		40	52.5 fg		90.0 a-d			
	20	10	52.5 fg	54.2 cd	90.0 a-d	89.17 ab		
		20	60.0 d-g		85.0 a-e			
		40	50.0 fg		92.5 a-c			
	40	10	50.0 fg	50.0 d	85.0 a-e	86.67 ab		
		20	47.5 fg		90.0 a-d			
		40	52.5 fg		85.0 a-e			
T0910131-1	10	10	47.5 fg	51.7 d	97.5 ab	93.33 a	59.7 b	77.8 b
		20	52.5 fg		100.0 a			
		40	55.0 e-g		82.5 b-f			
	20	10	75.0 a-e	61.7 b-d	72.5 e-g	65.83 d		
		20	65.0 c-g		67.5 fg			
		40	45.0 g		57.5 g			
	40	10	67.5 b-f	65.8 bc	75.0 d-f	74.17 cd		
		20	62.5 c-g		80.0 c-f			
		40	67.5 b-f		67.5 fg			

Ort.: Ortalama, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, Kon.: Konsantrasyonu

Çizelge 4.4. Kabukları soyulmamış olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 7. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) Genotip x Süre Ort.	B. O. (%)	B. O. (%) Genotip x Süre Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B. O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	90.0 a-c	94.2 a	97.5 ab	95.0 a	85.8 a	96.1 a
		20	92.5 ab		87.5 b-d			
		40	100.0 a		100.0 a			
	20	10	92.5 ab	90.0 a	92.5 a-c	95.8 a		
		20	85 a-d		100.0 a			
		40	92.5 ab		95.0 a-c			
	40	10	60.0 e-h	73.3 b	97.5 ab	97.5 a		
		20	70.0 c-g		95.0 a-c			
		40	90.0 a-c		100.0 a			
T0910285-1	10	10	55.0 f-h	54.2 c	97.5 ab	96.7 a	57.8 b	95.6 a
		20	52.5 gh		97.5 ab			
		40	55.0 f-h		95.0 a-c			
	20	10	60.0 e-h	68.3 b	95.0 a-c	95.8 a		
		20	75.0 b-f		92.5 a-c			
		40	70.0 c-g		100.0 a			
	40	10	50.0 gh	50.8 c	95.0 a-c	94.2 a		
		20	47.5 h		97.5 ab			
		40	55.0f-h		90.0 a-d			
T0910131-1	10	10	47.5 h	52.5 c	100.0 a	95.8 a	62.5 b	83.9 b
		20	52.5 gh		100.0 a			
		40	57.5 e-h		87.5 b-d			
	20	10	77.5 b-e	66.7 b	85.0 cd	75.8 b		
		20	67.5 d-h		80.0 de			
		40	55.0 f-h		62.5 f			
	40	10	70.0 c-g	68.3 b	80.0 de	80.0 b		
		20	65.0 d-h		90.0 a-d			
		40	70.0 c-g		70.0 ef			

Ort.: Ortalama, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, Kon.: Konsantrasyonu

4.1.2. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği genotiplerinde *in vitro* sterilizasyon optimizasyonu

Varyans analizi sonuçlarına göre, 3 farklı gözlem zamanında alınan çimlenme ve bulaşma oranı verileri doğrultusunda 3. ve 5. günlerde süre uygulaması bulaşma oranı üzerinde etkili olmamıştır (Çizelge 4.5). Bunun dışında tüm muameleler çimlenme ve bulaşma oranı üzerinde etkili olmuştur.

Üçüncü gün gözlem sonuçlarına göre genotip, süre, NaOCl konsantrasyonu interaksyonunda en yüksek çimlenme oranı, T0910285-1 genotipinde 40 dk. bırakılma ile elde edilirken (% 97.5) en düşük çimlenme oranı T0910131-1 genotipinin % 10 NaOCl uygulamasında (% 21.7) elde edilmiştir (Çizelge 4.6). En düşük bulaşma oranı, kabukları soyulmuş T0910285-1 genotipinden (% 13.8) elde edilirken en yüksek

bulaşma oranı ise T0910131-1 (% 47.2) genotipinde görülmüştür. Çimlenme oranı genellikle 40 dk. NaOCl uygulamasında diğer uygulamalara göre en yüksek değerlere ulaşmıştır. Çizelge 4.6' nın incelenmesinden de görüleceği gibi NaOCl konsantrasyonunun artması kısmen bulaşma oranını azalttığı için çimlenme olumlu yönde artış göstermiştir.

Çizelge 4.5. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında sterilizasyon optimizasyonu denemesi varyans analizi değerleri

Varyasyon Kaynağı	S. D.	3. gün (K.O.)		5. gün (K.O.)		7. gün (K.O.)	
		Ç.O.	B.O.	Ç.O.	B.O.	Ç.O.	B.O.
Konsantrasyon (K)	5	8480.9**	4578.9**	6264.4**	5404.4 **	6049.8**	7405.4**
Süre (S)	2	22406.9**	21.7	16359.7**	180.5	13757.0**	1006.5 *
Genotip (G)	2	28730.1**	23061.3**	27024.3**	41926.4**	20493.7 **	36138.1**
(K) x (S)	10	1631.3**	772.0**	1012.6**	1691.1**	1026.2 **	1487.7**
(K) x (G)	10	5040.2**	1390.5**	3727.8**	2022.8 **	2226.2**	2073.8 **
(S) x (G)	4	6467.7**	1016.8**	5531.5**	1611.5**	3928.5**	2441.4**
(K) x (S) x (G)	20	551.8**	856.6**	391.5**	1388.2 **	370.3**	1422.8 **
Hata	162	117.2	180.0	139.8	216.5	144.3	256.6
Toplam	215						
CV (%)		1.25	3.92	1.25	2.67	1.21	2.28

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S.D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, Ç.O.: Çimlenme oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, K.O.: Kareler Ortalaması

Beşinci gün yapılan gözlem sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme oranı T0910285-1 genotipinden (% 94.6), en düşük çimlenme oranı ise (% 56.1) T0910131-1 genotipinden elde edilmiştir. Bulaşma oranı değerleri açısından ise en fazla bulaşma maruz kalan genotip T0910131-1 olup (% 70.7) en düşük değerler ise T0910285-1 genotipinden (% 25.6) elde edilmiştir. Açıkça görüldüğü gibi tohum kaynaklı bulaşma oranının artması çimlenmenin azalmasına neden olmuştur. NaOCl içerisinde tutma süresinin artması ile birlikte bulaşma oranlarında azalma görülmüştür (Çizelge 4.7).

Yedinci gün gözlem sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme oranı (% 95.5) ve en düşük bulaşma oranı (% 32.6) T0910285-1 genotipinden elde edilmiştir. Çizelge 4.8.'den de görüldüğü gibi 40 dk.ve 20 dk. NaOCl çözeltisi içerisinde yüzey sterilizasyonu için bırakma en yüksek çimlenme oranlarının elde edilmesine neden olmuştur (% 99.6, % 96.3). NaOCl konsantrasyon oranının ve NaOCl solüsyonu içerisinde bırakma süresinin artması ele alınan birçok muamelede bulaşma oranının azalmasına ve buna bağlı olarak da çimlenme oranlarının artmasına sebep olmuştur (Çizelge 4.8).

Taški-Ajduković ve Vasić (2005)'in tohum sterilizasyonu ve çimlendirilmesi çalışması,

tohum kabuklarının soyulduktan sonra tekrar steril edilmesi ve düşük konsantrasyonda NaOCl ile ikinci kez steril edilmesi bakımından yaptığımız ikinci denemeye kısmen benzerlik göstermektedir.

Üç farklı uygulamayı [1. % 70, 85, 90, 95 etil alkol+5, 10, 15, 30 dk.; 2. %3.5 NaOCl+5, 10, 15, 20, 30, 45 dk.; 3. % 90 etil alkol+3 dk., % 3.5 NaOCl+30 dk.] börülce, sorgum ve çeltik tohumlarının yüzey sterilizasyonunda deneyen Oyebanji ve ark. (2009) 20-45 dk. sürelerde uygulanan % 3.5 NaOCl konsantrasyonunun sterilizasyonu sağlama açısından en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan kabukları soyulmuş börülce tohumları, çalışmamızda kullanılan ayçiçeği tohumları gibi, benzer şekilde 7 gün çimlenme ortamında bırakıldığında bulaşma oranı % 80-100'lere ulaşmıştır.

Çizelge 4.6. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 3. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) G x S Ort.	B. O. (%)	B. O. (%) G x S Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B. O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	100.0 a	59.6 d	27.5 h-l	18.3 cd	65.8 b	19.4 b
		20	97.5 a		35.0 g-j			
		30	35.0 f-ı		5.0 no			
		40	100.0 a		22.5 i-n			
		60	17.5 j-m		10.0 l-o			
	20	10	100.0 a	62.9 d	32.5 g-k	25.4c		
		20	97.5 a		55.0 c-f			
		30	42.5 d-g		2.5 o			
		40	100.0 a		47.5 d-g			
		60	32.5 f-j		2.5 o			
	40	10	100.0 a	75.0 c	32.5 g-k	14.6 de		
		20	97.5 a		32.5 g-k			
		30	45 d-f		0.0 o			
		40	97.5 a		5.0 no			
		60	52.5 de		7.5 m-o			
T0910285-1	10	10	100.0 a	79.3c	7.5 m-o	9.7 e		
		20	100.0 a		7.5 m-o			
		30	82.0 bc		8.3 m-o			
		40	95.0 ab		25.0 i-m			
		60	56.5 d		0.0 o			
	20	10	85.0 a-c	90.0 b	10.0 l-o	16.7 de		
		20	100.0 a		65.0 b-d			
		30	80.0bc		15.0 k-o			
		40	100.0 a		2.5 o			
		60	100.0 a		7.5 m-o			
	40	10	97.5 a	97.5 a	0.0 o	15.0 de		
		20	100.0 a		40.0 f-ı			
		30	100.0 a		15.0 k-o			
		40	87.5 a-c		2.5 o			
		60	100.0 a		12.5 l-o			
T0910131-1	10	10	40.0 e-h	21.7 f	45.0 e-h	52.5 a		
		20	27.5 g-k		32.5 g-k			
		30	25.0 h-k		27.5 h-l			
		40	2.5 m		82.5 ab			
		60	12.5 k-m		65.3 b-d			
	20	10	40.0 e-h	35.4 e	62.5 c-e	40.0 b		
		20	35.0 f-ı		45.0 e-h			
		30	12.5 k-m		22.5 i-n			
		40	17.5 j-m		22.5 i-n			
		60	85.0 a-c		50.0 c-g			
	40	10	95.0 ab	90.4 b	50.0 c-g	49.2 a		
		20	87.5 a-c		50.0 c-g			
		30	80.0 bc		55.0 c-f			
		40	92.5 ab		85.0 a			
		60	95.0 ab		10.0 l-o			
90	92.5 ab	67.5 a-c						
					27.5 h-l			
					50.0 c-g			

Ort: Ortalama, Kon.: Konsantrasyon, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, G x S: Genotip x Süre

Çizelge 4.7. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 5. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) G x S Ort.	B. O. (%)	B. O. (%) G x S Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B. O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	100.0 a	61.7 e	45.0 h-k	34.6 c	71.3 b	33.3 b
		20	97.5 ab		52.5 f-i			
		30	40.0 i-k		15.0 m-r			
		40	100.0 a		47.5 g-j			
		60	25.0 k-m		25.0 k-p			
		90	7.5 n		22.5 l-q			
	20	10	100.0 a	71.7 d	45.0 h-k	36.7 c		
		20	100.0 a		60.0 e-h			
		30	60.0 f-h		17.5 l-r			
		40	100.0 a		65.0 d-h			
		60	47.5 h-j		15.0 m-r			
		90	22.5 l-n		17.5 l-r			
	40	10	100.0 a	80.4 c	65.0 d-h	28.8 cd		
		20	97.5 ab		52.5 f-i			
		30	55.0 f-i		2.5 qr			
		40	100.0 a		7.5 o-r			
		60	67.5 e-g		25.0 k-p			
		90	62.5 f-h		20.0 l-r			
T0910285-1	10	10	100.0 a	90.0 b	10.0 n-r	19.0 e	94.6a	25.6 c
		20	100.0 a		12.5 m-r			
		30	87.3 a-c		11.0 n-r			
		40	95 a-c		30.0 j-n			
		60	87.5 a-c		13.0 m-r			
		90	70.0 d-f		37.5 i-l			
	20	10	90.0 a-c	95.4 ab	65.0 d-h	25.8 de		
		20	100.0 a		32.5 i-m			
		30	100.0 a		5.0 p-r			
		40	100.0 a		15.0 m-r			
		60	100.0 a		0.0 r			
		90	82.5 b-e		37.5 i-l			
	40	10	97.5 ab	98.3 a	100.0 a	31.8 cd		
		20	100.0 a		32.5 i-m			
		30	100.0 a		7.5 o-r			
		40	92.5 a-c		15.0 m-r			
		60	100.0 a		26.8 k-o			
		90	100.0 a		9.3 d-r			
T0910131-1	10	10	52.5 g-i	30.0 g	95.0 ab	81.3 a	56.1 c	70.7 a
		20	32.5 j-l		52.5 f-i			
		30	32.5 j-l		90.0 a-c			
		40	15.0 mn		82.5 a-d			
		60	25.0 k-m		82.5 a-d			
		90	22.5 l-n		85.0 a-d			
	20	10	50.0 hi	46.3 f	60.0 e-h	65.8 b		
		20	62.5 f-h		37.5 i-l			
		30	27.5 k-m		37.5 i-l			
		40	27.5 k-m		77.5 b-e			
		60	85.0 a-d		97.5 ab			
		90	25.0 k-m		85.0 a-d			
	40	10	95.0 a-c	92.1 ab	67.5 d-g	65.0 b		
		20	90.0 a-c		90.0 a-c			
		30	80.0 c-e		27.5 j-o			
		40	95.0 a-c		72.5 c-f			
		60	97.5 ab		65.0 d-h			
		90	95.0 a-c		67.5 d-g			

Ort.: Ortalama, Kon.: Konsantrasyon, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, G x S: Genotip x Süre

Çizelge 4.8. Kabukları soyulmuş olgun ayçiçeği tohumlarında genotip, sterilizasyon süresi ve NaOCl konsantrasyonunun çimlenme ve bulaşma oranları üzerine etkisi (Veriler 7. gün yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Genotip	Süre (dk.)	NaOCl Kon. (%)	Ç. O. (%)	Ç. O. (%) G x S Ort.	B. O. (%)	B. O. (%) G x S Ort.	Ç. O. (%) Genotip Ort.	B. O. (%) Genotip Ort.
T0910182-3	10	10	100.0 a	66.3 e	72.5 c-f	61.7 c	75.7 b	55.3 b
		20	97.5 a		92.5 a-c			
		30	52.5 fg		40.0 h-l			
		40	100.0 a		80.0 a-e			
		60	30.0 hi		52.5 f-h			
	90	17.5 i	32.5 h-p					
	20	10	100.0 a	76.7 d	85.0 a-e	60.4 c		
		20	100.0 a		85.0 a-e			
		30	67.5 d-f		47.5 g-j			
		40	100.0 a		87.5 a-d			
		60	57.5 ef		37.5 h-n			
	90	35.0 h	20.0 l-r					
	40	10	100.0 a	84.2 c	87.5 a-d	43.8 d		
		20	97.5 a		77.5 b-e			
		30	60.0 ef		17.5 m-r			
40		100.0 a	15.0 o-r					
60		80.0 b-d	30.0 i-p					
90	67.5 d-f	35.0 h-o						
T0910285-1	10	10	100.0 a	90.8 bc	20.0 l-r	27.0 e		
		20	100.0 a		17.5 m-r			
		30	87.3 a-c		16.3 n-r			
		40	97.5 a		42.5 h-k			
		60	87.5 a-c		25.5 j-q			
	90	72.5 c-e	40.0 h-l					
	20	10	92.5 ab	96.3 ab	65.0 e-g	30.4 e		
		20	100.0 a		47.5 g-j			
		30	100.0 a		5.0 qr			
		40	100.0 a		22.5 k-r			
		60	100.0 a		2.5 r			
	90	85.0 a-c	40.0 h-l					
	40	10	97.5 a	99.6 a	100.0 a	40.3 d		
		20	100.0 a		50.0 g-i			
		30	100.0 a		20.0 l-r			
40		100.0 a	20.0 l-r					
60		100.0 a	39.3 h-m					
90	100.0 a	12.5 p-r						
T0910131-1	10	10	65.0 d-f	36.0 g	100.0 a	88.8 a		
		20	35.0 h		82.5 a-e			
		30	37.5 gh		90.0 a-c			
		40	27.5 hi		87.5 a-d			
		60	28.3 hi		85.0 a-e			
	90	22.5 hi	87.5 a-d					
	20	10	67.5 d-f	57.9 f	67.5 d-g	72.1 b		
		20	80.0 b-d		47.5 g-j			
		30	27.5 hi		47.5 g-j			
		40	55.0 f		87.5 a-d			
		60	85.0 a-c		97.5 ab			
	90	32.5 hi	85.0 a-e					
	40	10	95.0 ab	92.1 b	80.0 a-e	71.3 b		
		20	90.0 ab		92.5 a-c			
		30	80.0 b-d		37.5 h-n			
40		95.0 ab	85.0 a-e					
60		97.5 a	65.0 e-g					
90	95.0 ab	67.5 d-g						

Ort: Ortalama, Kon.: Konsantrasyon, Ç.O.: Çimlenme Oranı, B.O.: Bulaşma Oranı, G x S: Genotip x Süre

4.2. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Embriyo İndüksiyon Ortamında Kalma Süresinin *In Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Ayçiçeği bitkisinde 10 farklı genotip, 4 farklı embriyo indüksiyon ortamında (EİO) yapılan gözlem tarihi ve 2 farklı eksplant kaynağının, kallus, sürgün, kök ve embriyo benzeri yapı (eby) oluşturma oranına ilişkin varyans analiz değerleri Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, genotip x eksplant x gözlem zamanı interaksyonu eby oluşturma oranı % 5 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli etkilerken, diğer tüm varyasyon kaynağı uygulamalarının ele alınan tüm özelliklerinde % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Genotip, eksplant ve gözlem zamanının kallus, sürgün, kök ve eby oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O.)	Sürgün O. O. (K.O.)	Kök O. O. (K.O.)	Eby O. O. (K.O.)
Genotip (G)	9	1.8**	98.6**	163.1**	85.4**
Eksplant (E)	1	67.7**	510.4**	540.0**	326.7**
Gözlem Zamanı (G.Z.)	3	13.7**	211.5**	161.1**	303.3**
(G) x (E)	9	0.9**	65.9**	163.1**	73.9**
(G) x (G.Z.)	27	0.2**	33.1**	55.9**	24.0**
(E) x (G.Z.)	3	1.4**	152.6**	161.1**	70.0**
(G) x (E) x (G.Z.)	27	0.2**	23.0**	55.9**	20.9*
Hata	160	0.0284	7.5	5.0	11.25
Toplam	239				
CV (%)		0.44	12.67	11.78	11.36

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, Eby: Embriyo benzeri yapı, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.10. incelendiğinde genellikle genotipe bağlı olarak 3. ve 4. haftalarda (nadiren 2. haftada) alınan gözlemlerden en yüksek kallus oluşturma değerleri elde edilmiştir. Buna göre en yüksek kallus oluşturma potansiyeli T0910182-2, T0910791-3, T0910817-1 genotiplerinin kotiledon eksplantlarında 4. hafta yapılan gözlemlerden elde edilirken, T0910791-4, T0910791-1, T0911033-2 ve T0910950-2 genotiplerinde ise yine kotiledon eksplantlarının 3. ve 4. hafta yapılan gözlemlerinden elde edilmiştir. Ayrıca T0910182-2 genotipinden alınan hipokotil eksplantının 4. haftasından ve T0910791-1 genotipinin ise 2. haftadan itibaren en yüksek oranda kallus oluşturduğu görülmektedir. Bu sonuçlar kotiledon eksplantlarının EİO'da 3-4 hafta süre ile inkübe edilmelerinin en fazla kallus oluşturma oranını verdiğini göstermektedir.

Kallus indüksiyonu ele alınan tüm genotiplerin kotiledon eksplantlarında ilk haftadan itibaren başlamış, genotipe bağı olarak hipokotil eksplantlarında ise 3-4 hafta içerisinde kallus indüksiyonu görülmüştür. T0911033-2, T0910285-1 genotiplerinin hipokotil eksplantları 4 hafta boyunca kallus oluşturmamıştır. Ayrıca T0910182-2, T0910791-3, T0910792-1, T0910791-1, T0910817-1, T0910950-2 genotiplerinin hipokotil eksplantlarında ilk 2 hafta kallus indüksiyonu görülmemiştir.

Çizelge 4.10. Ayçiçeği bitkisinde genotip, gözlem zamanı ve eksplant kaynağının kallus, sürgün, kök ve eby oluşturma oranı üzerine etkileri

Genotip	Eksplant Kaynağı	Gözlem Zamanı (Hafta)	Kallus Oluşturma Oranı (Skor)	Sürgün Oluşturma Oranı (%)	Kök Oluşturma Oranı (%)	Eby Oluşturma Oranı (%)
T0910182-2	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 e	0,00 d
		3	3,27 k-r	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,97 a	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
	Kotiledon	1	3,47 g-m	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,67 b-h	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,77 a-f	0,00 e	0,00 c	6,67 bc
		4	4,00 a	0,00 e	0,00 c	6,67 bc
T0910791-3	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	2,83 u-y	10,00 bc	0,00 c	10,00 b
		4	3,10 p-u	10,00 bc	0,00 c	10,00 b
	Kotiledon	1	3,23 l-r	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,57 d-j	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,57 d-j	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		4	3,83 a-d	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
T0910930-2	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	2,87 t-y	0,00 e	0,00 c	0,00 d
	Kotiledon	1	2,80 v-z	0,00 e	0,00 e	0,00 d
		2	3,20 m-r	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,37 i-p	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,63 c-i	0,00 e	0,00 c	0,00 d
T0910792-1	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		3	2,83 u-v	0,00 e	33,33 a	6,67 bc
		4	3,23 l-r	0,00 e	33,33 a	6,67 bc
	Kotiledon	1	3,20 m-r	0,00 e	0,00 e	0,00 d
		2	3,33 j-q	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		3	3,47 g-m	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		4	3,97 a	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
T0910791-4	Hipokotil	1	2,87 t-y	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,07 q-v	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,37 i-p	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,53 e-k	0,00 e	0,00 c	0,00 d
	Kotiledon	1	3,40 h-o	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,63 c-i	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,80 a-e	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,90 a-c	0,00 e	0,00 c	0,00 d
T0910791-1	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,03 r-w	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		4	3,40 h-o	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
	Kotiledon	1	3,53 e-k	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,80 a-e	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,93 ab	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,97 a	0,00 e	0,00 c	0,00 d
T0910817-1	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,13 o-t	20,00 a	0,00 c	6,67 bc
		4	3,30 j-r	20,00 a	0,00 e	6,67 bc
	Kotiledon	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,37 i-p	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,63 c-i	3,33 de	0,00 c	0,00 d
		4	3,80 a-e	3,33 de	0,00 c	3,33 cd
T0910285-1	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	0,00 z	13,33 b	13,33 b	6,67 bc
		4	0,00 z	13,33 b	13,33 b	6,67 bc
	Kotiledon	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,07 q-v	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,43 h-n	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	3,67 b-h	0,00 e	0,00 c	0,00 d
T0911033-2	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	3,33 de	0,00 e	6,67 bc
		3	0,00 z	6,67 cd	0,00 e	6,67 bc
		4	0,00 z	6,67 cd	0,00 c	6,67 bc
	Kotiledon	1	2,90 s-x	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,37 i-p	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,80 a-e	3,33 de	0,00 e	3,33 cd
		4	4,00 a	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
T0910950-2	Hipokotil	1	0,00 z	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	0,00 z	0,00 e	0,00 c	3,33 cd
		3	0,00 z	10,00 bc	0,00 c	20,00 a
		4	3,17 n-s	13,33 b	0,00 e	23,33 a
	Kotiledon	1	3,50 f-l	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		2	3,73 a-g	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		3	3,97 a	0,00 e	0,00 c	0,00 d
		4	4,00 a	0,00 e	0,00 c	3,33 cd

Denemede kullanılan 10 genotipten sadece 5 tanesinde (T0910791-3, T0910817-1, T0910285-1, T0911033-2, T0910950-2) sürgün regenerasyonu elde edilmiştir. T0910817-1 genotipinin hem kotiledon hem de hipokotil eksplantları sürgün oluşturma potansiyeline sahip olmuştur ve bu hipokotil eksplantından en yüksek sürgün oluşturma değeri alınmıştır (% 20).

Araştırma sonuçlarına göre çoğunlukla ele alınan genotipler kök oluşturmamıştır. Sadece T0910792-1 ve T0910285-1 genotiplerinin hipokotil eksplantlarında kök oluşumu gözlenmiştir.

Embriyo benzer yapı oluşturma oranları göz önüne alındığında T0910791-1 ve T0910285-1 genotiplerinin sadece hipokotil eksplantlarında, T0910182-2, T0910791-3, T0910792-1, T0910817-1, T0911033-2 ve T0910950-2 genotiplerinin hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarının % 3.3-23.3 arasında değişen oranlarda embriyo benzer yapılar oluşturduğu gözlenmiştir.

En yüksek sürgün regenerasyonu T0910950-2 genotipinin hipokotil eksplantlarının 3. ve 4. hafta yapılan gözlemlerinden elde edilmiştir (% 20.0-23.3).

Elde edilen sonuçlar genotip, eksplant kaynağı ve eksplantların EİO'da gelişme sürelerinde alınan gözlem zamanının, kallus oluşturma, organogenesis ve somatik embriyogenesis elde etmede önemli bir etkiye sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Genel bir değerlendirme yapıldığında her ele alınan yeni genotip için uygun eksplant kaynağının seçilmesi ve kültür ortamlarında kalma sürelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Genotip, ayçiçeği bitkisinde kallus oluşturma, organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşturma oranı üzerinde etkili olan en önemli faktörlerden birisidir. Benzer şekilde Paterson ve Everett (1985), Fiore ve ark. (1997), Azadi ve ark. (2002), Nestares ve ark. (2002), Özyiğit ve ark. (2006, 2007) organogenesis ve/veya embriyogenesis yoluyla bitki regenerasyonunda genotipin önemli olduğu sonucuna varmışlardır.

Regenerasyon üzerine etkili olan bir diğer faktör eksplant kaynağıdır. Çalışmamızda eksplant kaynağı ele alınan tüm regenerasyon parametreleri açısından % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Benzer şekilde, Knittel ve ark. (1991), Punia ve Bohorova (1992), Gürel ve Kazan (1998), Abdoli ve ark. (2003), Arda (2004), Vega ve ark. (2006), Dağüstü ve ark. (2008), Anitha ve ark. (2011) eksplant kaynağının, Greco

ve ark. (1984), Ceriani ve ark. (1992), Dağüstü ve ark. (1998), Shin ve ark. (2000), Yordanov ve ark. (2002), Aurori (2011) genotip ve eksplant kaynağının ayçiçeği bitki regenerasyonunda önemli etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu deneme sonuçlarından farklı olarak, Punia ve Bohorova (1992) ayçiçeğinin 6 yabancı türünden elde edilen farklı eksplant kaynaklarında kallus gelişimi ve bitki regenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, kotiledon eksplantlarının diğer eksplant kaynaklarına göre çok daha düşük oranda kallus oluşturduğunu saptamışlardır. Dağüstü ve ark. (1998) ayçiçeğinde *in vitro* regenerasyon çalışmasında hipokotil ve kotiledon eksplantlarını, eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır ve yalnızca kotiledon parçalarının % 4-10 oranında embriyoya benzer kallus oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında ise embriyoya benzer yapı oluşumları hem hipokotil (% 3.5) hem de kotiledon eksplantından (% 1.2) elde edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan genotip kaynaklarının farklı olması, farklı ayçiçeği türlerinin (yabancı ve kültürü yapılan türler) kullanılması ve varyans analizi sonuçlarından da görüldüğü gibi genotip x eksplant interaksiyonunun regenerasyon özellikleri açısından önemli ve etkili olması farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Bununla beraber, diğer araştırmacılar tarafından kullanılan farklı kültür ortamları, eksplant yaşı ve kültür şartlarının kullanılması da farklı bulguların elde edilme sebepleri olabilir.

4.3. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Gözlem Zamanı ve Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının *İn Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Araştırmada incelenen özelliklerden kallus oluşturma, sürgün oluşturma ve embriyogenik yapı oluşturma oranlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde, varyans analizi sonuçlarına göre, kallus oluşturma oranlarında genotip ve gözlem zamanı değerleri istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunurken, genotip x gözlem zamanı interaksiyonu istatistiki olarak % 5 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturma oranlarında genotip istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunurken, gözlem zamanı ve genotip gözlem zamanı interaksiyonu istatistiki olarak önemsiz olmuştur. Embriyo benzeri yapı oluşturma oranında incelenen tüm özellikler istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, genotip, olgunlaşmamış embriyo eksplantından kallus ve sürgün oluşturma oranında önemli bir etkiye sahip olmuştur.

Çizelge 4.11. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanının kallus, sürgün ve eby oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O)	Sürgün O. O. (K.O)	Eby O. O. (K.O)
Genotip (G)	1	3.3**	13066.7**	204.2
Gözlem Zamanı (G.Z.)	2	2.5**	4.2	16.7
(G) x (G.Z.)	2	0.0*	4.2	16.7
Hata	18	0.0049	25.0	145.8
Toplam	23			
CV (%)		0.57	5	13.9

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, Eby: Embriyo benzeri yapı, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.12'ye göre, RHA 16 genotipi 3. hafta en yüksek kallus oluşturma oranına (3.8 skor) sahip olurken, T0910241-3 genotipi ilk hafta en düşük kallus oluşturma oranına (2.1 skor) sahip olmuştur. T0910241-3 genotipi tüm haftalarda sürgün (ortalama % 46.7) oluştururken, RHA 16 genotipi hiç sürgün oluşturmamıştır. Kültür süresi boyunca RHA 16 genotipi (3.23 skor) T0910241-3 genotipinden (2.49 skor) daha yüksek oranlarda kallus oluşturmuştur. İki genotip karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşturma potansiyeli RHA 16 genotipinin 3. hafta yapılan gözlemlerinden elde edilmiştir (3.8 skor). Araştırma sonuçları her 2 genotipte de kallus indüksiyonu ve embriyo benzeri yapıların oluşumu olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında ilk haftadan itibaren başlamıştır. Eby oluşturma oranı % 17.5-25 arasında değişmiştir. Benzer şekilde Finer (1987), olgunlaşmamış embriyolarda eby oluşumunu kültürün 6. gününden itibaren gözlemlemiştir.

Çizelge 4.12. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanının kallus, sürgün ve eby oluşturma oranı üzerine etkisi

Genotip	Gözlem Zamanı (Hafta)	Kallus O. O. (Skor)	Sürgün O. O. (%)	Eby O. O. (%) Genotip Ort.	Kallus O. O. Genotip Ort. (Skor)	Sürgün O. O. Genotip Ort. (%)	Eby O. O. Genotip Ort. (%)
T0910241-3	1	2.1 e	45.0	20.0	2.5 b	46.7 a	23.3
	2	2.3 d	47.5	25.0			
	3	3.2 b	47.5	25.0			
RHA 16	1	2.8 c	0.0	17.5	3.2 a	0.0 b	19.2
	2	3.1 b	0.0	20.0			
	3	3.8 a	0.0	20.0			

Ort: Ortalama, O.O.: Oluşturma Oranı, Eby: Embriyo Benzeri Yapı

Elde edilen sonuçlara göre, genotip, olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında organogenesis yolu ile regenere bitki elde etmede önemli bir etkiye sahip olmuştur.

Çizelge 4.13. Ayçiçeği bitkisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı genotip ve gözlem zamanlarının kök oluşturma oranlarına ait verilerin ortalama tablosu

Genotip	Gözlem Zamanı (Hafta)	Kök Oluşturma Oranı (%) ± Standart Hata		
		Minimum	Maksimum	Ortalama± 0.72
T0910241-3	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
RHA 16	1	0	10	3.33
	2	0	10	3.33
	3	0	10	3.33

Çizelge 4.13. incelendiğinde, sadece RHA 16 genotipinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında kök oluşumu gözlenmiştir (% 3.33). Araştırma sonucunda, RHA 16 genotipinde embriyo indüksiyon ortamında kök oluşumunun ilk hafta başladığı ve embriyo indüksiyon ortamında kalma süresinin kök oluşumunda etkili olmadığı görülmektedir.

Özyiğit ve ark. (2006), farklı genotiplerin olgun embriyo eksplantlarından kallus indüksiyonu ve bitki regenerasyonu için rutin bir sistem geliştirmişlerdir ve çalışma sonuçlarında, *H. annuus*'ta biyoteknolojik uygulamalarda rutin bir bitki regenerasyonu sistemi geliştirmek için olgunlaşmamış embriyo eksplantları yerine olgun embriyo ve diğer eksplant kaynaklarının eksplant kaynağı olarak ele alınmasının, sezona bağımsız olma, kolay kullanım, dokuların daha kolay steril edilebilmesi gibi avantajlar sağladığını ve bu eksplant kaynaklarından bitki regenerasyonu elde edilebildiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da, ele alınan olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından bitki regenerasyonu sağlanamamış olmasına karşın, ele alınan diğer eksplant kaynaklarından (hipokotil, kotiledon) bitki regenerasyonu sağlanmıştır.

4.4. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve NAA/BA Konsantrasyonlarının *In Vitro* Regenerasyon Üzerine Etkisi

Ayçiçeği bitkisinde 2 farklı genotip ve 16 farklı BA/NAA hormon konsantrasyonlarını içeren embriyo indüksiyon ortamı ve 2 farklı eksplant kaynağının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranlarına ilişkin varyans analiz değerleri Çizelge 4.14.'te verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, sadece genotip x eksplant interaksyonu kallus oluşturma oranı yönünden % 5 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli

bulunurken, diğ er ele alınan tüm varyasyon kaynakları % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturma oranı yönünden eksplant x EİO interaksyonu % 5 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunurken, diğ er ele alınan tüm varyasyon kaynağı uygulamalarında % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Kök oluşturma oranı yönünden genotip ve genotip x eksplant interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmazken, diğ er ele alınan tüm varyasyon kaynağı uygulamalarında % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Bitkicik oluşturma oranı yönünden eksplant kaynağı ve eksplant kaynağı x genotip interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmazken, eksplant x EİO interaksyonu % 5 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Diğ er ele alınan tüm varyasyon kaynağı uygulamalarında ise % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

Çizelge 4.14. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve BA/NAA konsantrasyonlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranına ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O.)	Sürgün O. O. (K.O.)	Kök O. O. (K.O.)	Bitkicik O. O. (K.O.)
Genotip (G)	1	2.6 **	5633.3**	963.0	1054.7**
Eksplant (E)	1	98.5**	2700**	83750.5**	88.0
Hormon Konsantrasyonu (HK)	15	0.7**	633.9**	2.9**	476.6**
(G) x (E)	1	0.2*	1408.3**	325.5	42.2
(G) x (HK)	15	0.1**	527.8**	1.1**	530.2**
(E) x (HK)	15	0.2**	183.3*	2.1**	123.6*
(G) x (E) x (HK)	15	0.6**	209.4**	942.2**	162.2**
Hata	128	0.0003	0.6	2.1	0.4
Toplam	191				
CV (%)		0.60	11.95	5.77	14.69

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.15. incelendiğinde % 1.0/0.1 BA/NAA hormon konsantrasyonunu içeren embriyo indüksiyon ortamı dışında ele alınan tüm embriyo indüksiyon ortamlarında yalnızca kotiledon eksplantlarında her 2 genotipte de en yüksek kallus oluşturma oranı (4 skor) elde edilmiştir. Bu sonuçlar açıkça kotiledon eksplantlarının embriyo indüksiyon ortamlarında inkübe edilmeleri durumunda hipokotil eksplantlarına nazaran daha fazla kallus oluşturma eğilimi olduğunu göstermektedir. Kallus oluşumu ele alınan tüm embriyo indüksiyon ortamlarında her 2 genotipin her 2 eksplantında da gerçekleşmiştir (1.4-4.0

skor). Bununla beraber, en fazla kallus oluşturma oranlarının elde edildiği embriyo indüksiyon ortamı % 0.5/1.0 BA/NAA içeren ortam olmuştur (3.34 skor). Hormon konsantrasyonu ve kombinasyonu uygulamalarının 9'u aynı istatistiksel gruba girerek 3.18-3.34 arasında değişen değerlerde kallus oluştururken en yüksek kallus oluşturma oranı % 0.5/1.0 BA/NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre % 0.5/0.1 BA/NAA içeren besi ortamı dışındaki ele alınan tüm besi ortamlarında kök oluşumu gözlenmiştir. En yüksek kök oluşturma oranı % 1.0/1.0 BA/NAA içeren besi ortamında Sirena genotipinin hipokotil eksplantından elde edilmiştir (% 100). En yüksek oranda kök oluşturma oranı % 0.1 BA + %1.0 NAA, % 0.1 BA + %1.5 NAA içeren besi ortamlarından elde edilmiştir. Denemede kullanılan her 2 genotip ve eksplant kaynağından sürgün regenerasyonu elde edilmiştir. % 1.0/0.1 ve % 1.5/1.0 BA/NAA içeren ortamlar dışında ele alınan tüm ortamlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. En yüksek oranda sürgün oluşturma oranı Sirena genotipinin hipokotil eksplantında % 0.1/1.5 BA/NAA içeren ortamda olmuştur (% 63.33). En yüksek sürgün oluşturma oranı 16 farklı hormon konsantrasyonu içersinden % 0.1/1.5 BA/NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (% 30.8). Bitkicik oluşturma oranları göz önüne alındığında 2 genotipin 2 eksplant kaynağında da bitkicik oluşumu gözlenmiştir. En yüksek bitkicik oluşturma oranı Pactol genotipinin hipokotil eksplantlarında % 0.1/0.1 BA/NAA içeren besi ortamından elde edilmiştir (% 53.3). Hormon konsantrasyonlarının bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri incelendiğinde en yüksek bitkicik oluşturma oranı % 0.1 BA/NAA, % 0.1/1.5 BA/NAA içeren besi ortamlarından elde edilmiştir (% 17.5-18.3). Araştırma sonuçlarına göre, Sirena genotipinin hipokotil eksplantlarından en yüksek oranda organogenesis elde edilirken, Pactol genotipinin hipokotil eksplantlarından ise en yüksek bitkicik oluşumu sağlanmıştır. Üçlü interaksiyon analizi sonuçlarına göre hipokotil eksplant kaynağı bitki regenerasyonu çalışmalarında genellikle kotiledon eksplant kaynağından daha yüksek performans göstermiştir. Sonuç olarak ele alınacak genotiplerin farklı eksplant kaynakları kullanıldığında farklı % BA/NAA oranlarının farklı oranlarda kallus, kök ve sürgün oluşturmaları nedeni ile ileride yapılacak çalışmaların amacına göre ele alınan genotiplere ve eksplantlarına bağlı olarak besi ortamına ilave edilecek hormon konsantrasyonlarının dikkatli bir biçimde belirlenmesi gerekmektedir.

Anitha ve ark. (2011) ayçiçeği üzerine yaptıkları *in vitro* çalışmalarda ele aldıkları 5 farklı genotipe ait 3 farklı eksplant kaynağının (hipokotil, kotiledon ve primordial

yapraklar) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamlarında kallus indüksiyonu ve bitki regenerasyonu değerlerini karşılaştırdıklarında, bu tez çalışmasının bulgularına benzer şekilde, en yüksek oranda bitki regenerasyonunu % 0.05 BA (%97.7) ve % 0.1 BA ve % 0.1 NAA (% 92) ilave edilmiş MS ortamında hipokotil eksplantında gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda da paralel şekilde % 0.1 BA ve % 0.1 NAA ilave edilmiş MS ortamında en yüksek oranda bitki regenerasyonu Pactol genotipinin hipokotil eksplantında gözlenmiştir (% 53.33).

Çizelge 4.15. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve BA/NAA konsantrasyonlarının kallus, kök, sürgün ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

H. K. (BA/NAA)	Genotip	Eksplant	Kallus O. O. (Skor)	Kallus O. O. H. K. Ort. (Skor)	Kök O. O. (%)	Kök O. O. H. K. Ort. (%)	Sürgün O. O. (%)	Sürgün O. O. H. K. Ort. (%)	Bitkicik O. O. (%)	Bitkicik O. O. H. K. Ort. (%)
0.1/0.1	Pactol	Hipokotil	2.00 no	2.73 e	0.00 l	5.00 fg	3.33 hu	2.50 b-d	53.33 a	18.33 a
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		20 c-e	
	Sirena	Hipokotil	2.17 k-o		0.00 l		0.00 ı		0 h	
		Kotiledon	2.73 e-ı		20.00 i-l		6.67 g-ı		0 h	
0.1/0.5	Pactol	Hipokotil	2.07 m-o	2.97 d	70.00 b-e	24.17 de	6.67 g-ı	10.00 b	20 c-e	8.33 b
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		13.33 e-g	
	Sirena	Hipokotil	2.87 c-g		0.00 l		6.67 g-ı		0 h	
		Kotiledon	2.93 c-f		13.33 j-l		26.67 c-e		0 h	
0.1/1.0	Pactol	Hipokotil	2.50 h-k	3.15 bc	86.67 a-c	51.67 a	3.33 hu	8.33 bc	30 bc	9.17 b
		Kotiledon	4.00 a		13.33 j-l		6.67 g-ı		6.67 f-h	
	Sirena	Hipokotil	2.93 c-f		93.33 ab		16.67 e-h		0 h	
		Kotiledon	3.20 c		13.33 j-l		6.67 g-ı		0 h	
0.1/1.5	Pactol	Hipokotil	2.60 f-j	3.29 ab	66.67 b-f	49.17 a	6.67 g-ı	30.83 a	23.33 c-e	17.50 a
		Kotiledon	4.00a		0.00 l		0.00 ı		40 b	
	Sirena	Hipokotil	2.90 c-f		90.00 ab		63.33 a		0 h	
		Kotiledon	3.67 ab		40.00 f-j		53.33 ab		6.67 f-h	
0.5/0.1	Pactol	Hipokotil	2.1 l-o	3.02 cd	0.00 l	0.83 g	3.33 hu	0.83 cd	0 h	7.50 b
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		13.33 e-g	
	Sirena	Hipokotil	2.03 no		0.00 l		0.00 ı		16.67 d-f	
		Kotiledon	3.93 ab		0.00 l		0.00 ı		0 h	
0.5/0.5	Pactol	Hipokotil	2.30 j-n	3.23 ab	0.00 l	17.50 ef	10 f-ı	8.33 bc	3.33 gh	9.17 b
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.70 e-ı		66.67 b-f		23.33 d-f		6.67 f-h	
		Kotiledon	3.93 ab		0.00 l		0.00 ı		26.67 cd	
0.5/1.0	Pactol	Hipokotil	3.10 cd	3.34 a	60.00 c-g	31.67 b-d	0.00 ı	6.67 bd	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		23.33 h-l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.33 j-n		43.33 e-ı		26.67 c-e		3.33 gh	
		Kotiledon	3.93 ab		0.00 l		0.00 ı		0 h	
0.5/1.5	Pactol	Hipokotil	2.50 h-k	3.20 ab	70.00 b-e	32.50 b-d	0.00 ı	3.33 b-d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.30 j-n		60.00 c-g		13.33 e-ı		0 h	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.0/0.1	Pactol	Hipokotil	1.43 p	2.37 f	10.00 kl	5.00 fg	0.00 ı	0.00 d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	3.60 b		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	1.50 p		10.00 kl		0.00 ı		3.33 gh	
		Kotiledon	2.93 c-f		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.0/0.5	Pactol	Hipokotil	2.80 d-h	3.18 a-c	26.67 h-l	23.33 de	0.00 ı	3.33 b-d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.00 no		66.67 b-f		13.33 e-ı		3.33 gh	
		Kotiledon	3.93 ab		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.0/1.0	Pactol	Hipokotil	2.70 e-ı	3.14 bc	60.00 c-g	40.00 a-c	0.00 ı	10.00 b	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	1.87 o		100.00 a		40 bc		3.33 gh	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.0/1.5	Pactol	Hipokotil	2.43 i-l	3.25 ab	50.00 d-h	22.50 de	3.33 hu	5.83 b-d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.60 f-j		40.00 f-j		20 e-g		0 h	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.5/0.1	Pactol	Hipokotil	2.80 d-h	3.18 a-c	86.67 a-c	43.33 ab	3.33 hu	10.00 b	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		13.33 j-l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.27 j-n		73.33 a-d		36.67 cd		3.33 gh	
		Kotiledon	3.67 ab		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.5/0.5	Pactol	Hipokotil	3.00 c-e	3.25 ab	0.00 l	16.67 ef	0.00 ı	5.83 b-d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.00 no		66.67 b-f		23.33 d-f		0 h	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.5/1.0	Pactol	Hipokotil	2.80 d-h	3.30 ab	20.00 i-l	15.00 ef	0.00 ı	0.00 d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.40 i-m		40.00 f-j		0.00 ı		0 h	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
1.5/1.5	Pactol	Hipokotil	2.53 c-j	3.15 bc	73.33 a-d	27.50 c-e	0.00 ı	4.17 b-d	0 h	0.00 c
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	
	Sirena	Hipokotil	2.1 l-o		36.67 g-k		16.67 e-h		0 h	
		Kotiledon	4.00 a		0.00 l		0.00 ı		0 h	

H.K. : Hormon Konsantrasyonu, Ort. : Ortalama, O.O. : Oluşturma Oranı

4.5. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Çimlendirme Sürelerinin *In Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Ayçiçeği bitkisinde, 2 farklı genotip, 5 farklı çimlendirme süresi ve 2 farklı eksplant kaynağının kallus ve kök oluşturma oranına ilişkin varyans analiz değerleri Çizelge 4.16.'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, genotip, genotip x eksplant, genotip x çimlendirme süresi interaksyonu ve genotip x eksplant x çimlendirme süresi interaksyonu kallus oluşturma oranı yönünden % 5 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunurken, diğer ele alınan tüm varyasyon kaynağı uygulamalarında % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar elde edilmiştir. Kök oluşturma oranı yönünden eksplant x çimlendirme süresi interaksyonu % 1 olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunurken, çimlendirme süresi, genotip x çimlendirme süresi, genotip x çimlendirme süresi x eksplant % 1 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kök oluşturma oranı yönünden genotip x eksplant ve genotip x eksplant interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.16. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının kallus ve kök oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O.)	Kök O.O. (K.O)
Genotip (G)	1	120.4*	481.7
Eksplant (E)	1	15360.0**	1.7
Çimlendirme Süresi (ÇS)	4	136.1**	1433.3*
(G) x (E)	1	50.4*	15.0
(G) x (ÇS)	4	37.9*	1331.7*
(E) x (ÇS)	4	119.6**	2426.7**
(G) x (E) x (ÇS)	4	110.6*	298.3*
Hata	40	17.1	471.7
Toplam	59		
CV (%)		0.8	12.4

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.17. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının kallus ve kök oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Çimlendirme Süresi (Gün)	Genotip	Eksplant	Kallus O. O. (%)	Kallus O. O. Çimlendirme Süresi Ort. (%)	Kök O. O. (%)	Kök O. O. Çimlendirme Süresi Ort. (%)
1	Sirena	Kotiledon	58.33 e	79.12 bc	13.33 c-e	45.00 a
		Hipokotil	100.00 a		60.00 ab	
	Pactol	Kotiledon	66.67 d		26.67 b-e	
		Hipokotil	91.67 bc		80.00 a	
3	Sirena	Kotiledon	56.67 e	77.71 c	46.67 a-c	26.67 b
		Hipokotil	98.33 ab		33.33 b-e	
	Pactol	Kotiledon	59.17 e		13.33 c-e	
		Hipokotil	96.67 ab		13.33 c-e	
5	Sirena	Kotiledon	68.33 d	80.42 bc	30.00 b-e	29.17 ab
		Hipokotil	85.00 c		26.67 b-e	
	Pactol	Kotiledon	68.33 d		40.00 b-d	
		Hipokotil	100.00 a		20.00 c-e	
7	Sirena	Kotiledon	58.33 e	82.08 b	6.67 de	18.33 b
		Hipokotil	100.00 a		0.00 e	
	Pactol	Kotiledon	70.00 d		46.67 a-c	
		Hipokotil	100.00 a		20.00 c-e	
9	Sirena	Kotiledon	72.50d	86.46 a	30.00 b-e	18.33 b
		Hipokotil	100.00 a		0.00 e	
	Pactol	Kotiledon	73.33 d		23.33 c-e	
		Hipokotil	100.00 a		20.00 c-e	

Ort. : Ortalama, O.O. : Oluşturma Oranı

Çizelge 4.17. incelendiğinde hipokotil eksplantlarından kallus oluşturma oranı kotiledon eksplantlarının kallus oluşturma oranlarından daha yüksek olmuştur. Tüm çimlendirme sürelerinde kallus oluşumu görülmekle beraber (% 56.67-100) en yüksek kallus oluşturma oranı 9 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilen eksplant kaynaklarından sağlanmıştır (% 86.46). En yüksek kök oluşturma oranı 1 günlük çimlenmiş tohumlardan elde edilmiştir (% 45). En yüksek kök oluşturma oranı Pactol genotipinin 1 günlük çimlenmiş tohumlarından elde edilen hipokotil eksplant kaynağında gözlemlenirken (% 80), Sirena genotipinin 7 ve 9 günlük çimlenmiş tohumlarından elde edilen hipokotil eksplantlarında köklenme olmamıştır.

Çizelge 4.18. Ayçiçeği bitkisinde genotip, çimlendirme süresi ve eksplant kaynağının sürgün, embriyo benzer yapı ve bitkicik oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin ortalama tablosu (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Ç. S. (Gün)	Genotip	Eksplant	Sürgün O. O. (%) ± S. H.			Eby O.O. (%) ± S.H.			Bitkicik O.O. (%) ± S.H.		
			Min.	Mak	Ort±1.62	Min.	Mak	Ort ±0.78	Min.	Mak	Ort±1.34
1	Sirena	Kotiledon	0	10	3.33	0	20	6.66	0	0	0
		Hipokotil	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pactol	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	0	0	0	20	6.66	0	0	0
3	Sirena	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pactol	Kotiledon	0	80	26.66	0	0	0	0	60	20
		Hipokotil	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Sirena	Kotiledon	0	10	3.33	0	10	3.33	0	0	0
		Hipokotil	0	10	3.33	0	20	6.66	0	20	6.66
	Pactol	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Sirena	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	20	6.66	0	0	0	0	10	3.33
	Pactol	Kotiledon	0	0	0	0	10	3.33	0	0	0
		Hipokotil	0	40	13.33	0	20	6.66	0	40	13.33
9	Sirena	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	20	6.66	0	0	0	0	20	6.66
	Pactol	Kotiledon	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hipokotil	0	20	6.66	0	20	6.66	0	20	6.66

Ç.S.: Çimlendirme Süresi, Ort.:Ortalama, O.O.: Oluşturma Oranı, S.H.: Standart Hata, Min.: Minimum, Mak.: Maksimum, Eby: Embriyo benzer yapı

Çizelge 4.18. incelendiğinde tüm çimlendirme sürelerinde sürgün oluşumu (% 3.33-26.6) gözlenmekle beraber, en yüksek oranda sürgün oluşumu 3 günlük çimlendirme süresinde Pactol genotipinin kotiledon eksplantından elde edilmiştir (% 26.66). Embriyo benzeri yapılar 3 günlük çimlendirme süresi dışında ele alınan tüm çimlendirme sürelerinde gözlenmiştir (% 3.33-6.66). En yüksek oranda eby oluşumu, Pactol genotipinde 1 günlük çimlendirme süresi dışındaki tüm çimlendirme sürelerinde çimlendirilmiş tohumlardan sağlanan hipokotil eksplantlarından elde edilirken, Sirena genotipinde, 1 günlük çimlendirme süresinde çimlendirilmiş tohumlardan sağlanan kotiledon eksplantlarından ve 5 günlük çimlendirme süresinde çimlendirilmiş tohumlardan sağlanan hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir (% 6.66). Bitkicik oluşumu 1 günlük çimlendirme süresi dışında ele alınan tüm çimlendirme sürelerinde gözlenmekle beraber (% 3.33-20), en yüksek oranda bitkicik oluşumu Pactol genotipinin 3 günlük çimlenmiş tohumlarından sağlanan kotiledon eksplantlarından elde edilmiştir (% 20).

Aurori (2011), ayçiçeği bitkisinde çimlenmeden 1-6 gün sonra tohumların embriyonik eksenleri ve kotiledon parçalarını 2 farklı kültür ortamında inkübe etmiş ve 2 günlük çimlenmiş tohumlardan sağladığı kotiledonların en yüksek sürgün regenerasyon

yeteneğini gösterdiğini belirlemiştir (% 20-30). Benzer şekilde bizim yaptığımız çalışmada da en yüksek sürgün regenerasyonu kotiledon eksplant kaynağının 3 günlük çimlenmiş tohumlarından sağlanmıştır (% 20).

4.6. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve Aydınlanma Koşullarının *In Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Araştırmada incelenen özelliklerden kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Çizelge 4.19 incelendiğinde, varyans analizi sonuçlarına göre, kallus ve bitkicik oluşturma oranlarında ele alınan tüm varyasyon kaynakları % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturma oranında eksplant kaynağı istatistiki olarak önemsiz olmuştur. Genotip x eksplant interaksyonu istatistiki olarak % 5 olasılık düzeyinde önemli ve ele alınan diğer varyasyon kaynakları % 1 olasılık düzeyinde önemli olmuştur. Kök oluşturma oranında genotip x eksplant x aydınlanma koşulu interaksyonu istatistiki olarak % 5 olasılık düzeyinde önemli olurken, diğer varyasyon kaynakları istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli olmuştur.

Çizelge 4.19. Ayçiçeği bitkisinde genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşulunun kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 8. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O.)	Sürgün O.O. (K.O.)	Kök O.O. (K.O.)	Bitkicik O.O. (K.O.)
Genotip (G)	1	0.07**	168.75**	1302.083**	468.75**
Eksplant (E)	1	17.76**	2.08	23852.08**	918.75**
Aydınlanma Koşulu (A)	3	0.09**	40.97**	1690.97**	318.75**
(G) x (E)	1	0.07**	18.75*	352.08**	468.75**
(G) x (A)	1	0.19**	24.31**	674.31**	157.64**
(E) x (A)	3	0.09**	113.19**	457.64**	318.75**
(G) x (E) x (A)	3	0.19**	74.31**	90.97*	157.64**
Hata	32	0.007	4.68	23.43	5.2
Toplam	47				
CV (%)		5.21	14.13	2.2	9.22

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.20. Ayçiçeği bitkisinde genotip, eksplant kaynağı ve aydınlanma koşulunun kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 8. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Aydınlanma Koşulları (Ç.O./EİO)	Genotip	Eksplant	KL. O.O. (skor)	KL.OO. AKOrt (skor)	S.O.O. (%)	SOO A.K. Ort. (%)	K. O.O. (%)	K.O.O. A.K. Ort. (%)	B. O.O. (%)	B. O.O. A. K. Ort. (%)
Işık/Karanlık	Sirena	Kotiledon	2.13 e	3.28 c	0.00 c	3.33 a	30.0 d	45.83 a	0.00 d	0 c
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		93.3 a		0.00 d	
	Pactol	Kotiledon	3.00 b		0.00 c		0.0 g		0.00 d	
		Hipokotil	4.00 a		13.33 a		60.0 b		0.00 d	
Işık/Işık	Sirena	Kotiledon	2.90 bc	3.37 b	0.00 c	0 b	26.7 de	47.5 a	0.00 d	0 c
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		66.7 b		0.00 d	
	Pactol	Kotiledon	2.57 d		0.00 c		30.0 d		0.00 d	
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		66.7 b		0.00 d	
Karanlık/Işık	Sirena	Kotiledon	2.83 c	3.43 ab	3.33bc	4.17 a	3.3 g	21.67 c	3.33 cd	7.5 b
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		50.0 c		0.00 d	
	Pactol	Kotiledon	2.87 bc		13.33 a		6.7 g		26.67 b	
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		26.7 de		0.00 d	
Karanlık/Karanlık	Sirena	Kotiledon	2.97 bc	3.49 a	0.00 c	3.33 a	16.7 f	40.83 b	6.67 c	10 a
		Hipokotil	4.00 a		0.00 c		66.7 b		0.00 d	
	Pactol	Kotiledon	3.00 b		0.00 c		20.0 ef		33.33 a	
		Hipokotil	4.00 a		6.67 b		60.0 b		0.00 d	

KL.O.O.: Kallus Oluşturma Oranı, S.O.O.:Sürgün Oluşturma Oranı, K.O.O.: Kök Oluşturma Oranı, B.O.O.: Bitkicik Oluşturma Oranı, Ort.:Ortalama, Ç.O.: Çimlendirme Ortamı, EİO: Embriyo İndüksiyon Ortamı A.K. : Aydınlanma Koşulu

Farklı aydınlanma süresi x genotip x eksplant interaksyonunu değerlerinin kallus (skor), sürgün (%), kök (%) ve bitkicik oluşturma (%) verilerinin yer aldığı Çizelge 4.20' ye göre en yüksek kallus ve bitkicik oluşturma oranlarının elde edildiği (3.49 skor-% 10) aydınlanma koşulu karanlık/karanlık olurken, en yüksek kök oluşturma oranının elde edildiği aydınlanma koşulu ışık/karanlık ve ışık/ışık olmuştur. Sürgün oluşumu ise ışık/ışık aydınlanma koşulu dışındaki ele alınan tüm uygulamalarda aynı istatistiksel gruba giren değerleri almıştır (% 3.33-4.17). Ele alınan tüm uygulamalarda kallus oluşumu gözlenmekle beraber (2.13-4 skor), en yüksek kallus oluşturma oranı tüm aydınlanma koşullarında her 2 genotipin yalnızca hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir (4 skor). En yüksek sürgün oluşturma oranı Pactol genotipinin hipokotil eksplant kaynağından ışık/karanlık aydınlanma koşulunda, kotiledon eksplant kaynağından karanlık/ışık aydınlanma koşulunda elde edilmiştir (% 13.33). En yüksek kök oluşturma oranı Sirena genotipinin hipokotil eksplantının ışık/karanlık aydınlanma koşulunda elde edilirken (% 93.33), yine aynı aydınlanma koşulunda Pactol genotipinin kotiledon eksplant kaynağı hiç kök oluşturmamıştır. Bitkicik oluşumu her 2 genotipin de sadece kotiledon eksplant kaynaklarından karanlık/ışık ve karanlık/karanlık aydınlanma koşullarında elde edilirken, en yüksek bitkicik oluşturma oranı Pactol

genotipinin kotiledon eksplant kaynağından karanlık/karanlık koşullardan elde edilmiştir (% 33.33).

Fiore ve ark. (1997), bizim yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarına paralel olarak, ayçiçeği bitkisinde somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki regenerasyonunu karanlık koşullarda çimlendirdikleri tohumlardan aldıkları kotiledon eksplant kaynaklarını yine karanlık koşullarda EİO besi ortamlarında inkübe ettikleri uygulamadan sağlamışlardır. Bu çalışmada 4 farklı ayçiçeği genotipi kullanmışlardır ve elde ettikleri somatik embriyogenesis oranı genotipe bağlı olarak % 33-72 arasında değişmiştir.

4.7. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Kotiledon Eksplantlarına Uygulanan Mekanik Zedeleme ve Kotiledon Eksplantlarının EİO'ya Bırakılma Şeklinin *In Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Araştırmada incelenen özelliklerden kallus, sürgün ve kök oluşturma oranlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.21'de verilmiştir. Çizelge 4.21 incelendiğinde, kallus oluşturma oranında genotip istatistiki olarak % 5 olasılık düzeyinde önemli bulunurken, diğer varyasyon kaynakları istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli olmuştur. Sürgün ve kök oluşturma oranında ise ele alınan tüm varyasyon kaynakları istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.21. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şekillerinin kallus, sürgün ve kök oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K.O.)	Sürgün O. O. (K.O.)	Kök O. O. (K.O.)
Genotip (G)	1	0.06*	16.67**	204.17**
Zedeleme (Z)	3	2.24**	66.67**	248.61**
(G) x (Z)	3	0.07**	16.67**	193.1**
Hata	16	0.009	1.04	5.2
Toplam	23			
CV (%)		1.4	15	5

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.22. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, kotiledon eksplantlarına uygulanan mekanik zedeleme ve kotiledon eksplantlarının EİO'ya bırakılma şekillerinin kallus, sürgün ve kök oluşturma oranı üzerine etkileri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

M. Z.	Genotip	Kallus O. M. (Skor)	Kallus O. O. M. Z. Ort. (Skor)	Sürgün O. O. (%)	Sürgün O. O. M. Z. Ort. (%)	Kök O. O. (%)	Kök O. O. M. Z. Ort. (%)
Düz	Pactol	1.23 c	1.13 c	10.00 a	6.67 a	13.33 b	11.67 b
	Sirena	1.13 cd		0.00 c		10.00 bc	
Ters	Pactol	2.10 b	1.20 c	0.00 c	0.00 b	0.00 d	8.33 c
	Sirena	2.13 b		0.00 c		10.00 bc	
Düz Zedeli	Pactol	1.00 d	2.13 b	3.33 b	0.00 b	10.00 bc	5.00 d
	Sirena	1.27 c		0.00 c		6.67 c	
Ters Zedeli	Pactol	2.20 b	2.30 a	0.00 c	0.00 b	10.00 bc	20.00 a
	Sirena	2.47 a		0.00 c		30.00 a	

M. Z. : Mekanik Zedeleme, Ort. :Ortalama, O. O. : Oluşturma Oranı

Farklı mekanik zedeleme uygulama değerlerinin kallus (skor), sürgün (%) ve kök (%) oluşturma oranına etkisine ait verilerinin yer aldığı Çizelge 4.22'ye göre kallus ve kök oluşturma oranı bakımından kotiledon eksplantlarının zedelenecek embriyo indüksiyon besi ortamına ters şekilde bırakıldığı uygulama en yüksek değerleri verirken (2.3 skor, % 20), sürgün oluşumu sadece mekanik zedelemenin olmadığı ve kotiledon eksplantlarının embriyo indüksiyon besi ortamına düz şekilde bırakıldığı uygulamadan elde edilmiştir (% 6.67). Kallus oluşumu tüm uygulamalardan elde edilirken (1.13-2.3 skor), en yüksek kallus oluşturma oranı Sirena genotipinin kotiledon eksplantlarının embriyo indüksiyon ortamına zedelenecek ters şekilde bırakıldığı uygulamadan elde edilmiştir (2.3 skor). Sürgün oluşumu ise sadece Pactol genotipinde kotiledon eksplantlarının zedelenecek ve zedelenmeden düz şekilde embriyo indüksiyon ortamına bırakıldığı uygulamalardan elde edilmiştir (% 3.33-10.00). En yüksek kök oluşturma oranı Sirena genotipinin kotiledon eksplantlarının zedelenecek ters şekilde embriyo indüksiyon ortamına bırakıldığı uygulamadan elde edilirken (% 30.00), Pactol genotipinin kotiledon eksplantlarının ters şekilde embriyo indüksiyon ortamına bırakıldığı uygulamada kök oluşmamıştır.

Fide yaşı, enlemesine kesilen kotiledon eksplantının üst ve alt parçası, ışık ve yaralama muamelelerinin havuç bitkisinde somatik embriyogenez üzerine etkisini araştıran Dağüstü ve ark. (1998) ele alınan faktörler arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar bulmuştur. Zedelenmiş dokulardan somatik embriyo ve kallus oluşumunun çalışmamızda olduğu gibi zedelenmiş dokularda zedelenmemiş dokulara nazaran daha

fazla olduğunu bulmuşlardır. Kotiledon eksplantının yaralanması kallus üretimi üzerinde bariz bir etki yapmıştır. Yeoman ve Forche (1976) yaralamanın ortama ilave edilen uyarıcıların eksplant tarafından alınmasına yardımcı olduğunu savunmaktadır. Bununla beraber yaralama, yaralı bölgenin etrafında bulunan hücrelerin embriyogenik tepkisini de uyandırabilir.

4.8. Ayçiçeği Bitkisinde Farklı Genotip, Eksplant Kaynağı ve EİO Bazal Ortamlarının *In Vitro* Regenerasyon Değerleri Üzerine Etkisi

Araştırmada incelenen özelliklerden kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.23'te verilmiştir. Çizelge 4.23 incelendiğinde, kallus oluşturma oranında genotip istatistiki olarak önemsiz bulunurken, diğer varyasyon kaynakları istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli olmuştur. Sürgün oluşturma oranlarında eksplant kaynağı istatistiki olarak % 5, genotip, besi ortamı ve besi ortamı x genotip etkileşimleri de istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Diğer varyasyon kaynakları ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Kök oluşturma oranında tüm varyasyon kaynakları istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Bitkicik oluşturma oranı değerlerinde ise genotip x ortam etkileşimi istatistiki olarak % 5 olasılık düzeyinde önemli bulunurken, genotip ve ortam istatistiki olarak % 1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Diğer varyasyon kaynakları ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.23. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranlarına etkisine ait verilerin varyans analizi değerleri (Veriler 4. hafta yapılan gözlemlerden alınmıştır)

Varyasyon Kaynağı	S. D.	Kallus O. O. (K. O.)	Sürgün O. O. (K. O.)	Kök O. O. (K. O.)	Bitkicik O. O. (K. O.)
Genotip (G)	1	0	375**	843.75**	806.67**
Eksplant (E)	1	26.67**	135*	6510.42**	106.67
Ortam (EİO)	4	1.80**	914.17**	6729.58**	605.83**
(G) x (E)	1	2.4**	15	220.42**	106.67
(G) x (EİO)	4	1.31**	137.5**	272.92**	135.83*
(E) x (EİO)	4	0.5**	30.83	1439.58**	44.17
(G) x (E) x (EİO)	4	0.61**	77.5	224.58**	77.5
Hata	40	0.02	33.33	15	41.66
Toplam	59				
CV (%)		0.83	7.7	2.6	11.34

*, **: Sırasıyla 0.05 ve 0.01 olasılık düzeylerinde istatistiki olarak önemlidir. EİO: Embriyo İndüksiyon Ortamı, S. D. : Serbestlik derecesi, CV: Varyasyon Katsayısı, K.O.: Kareler Ortalaması, O.O.: Oluşturma Oranı

Çizelge 4.24. Ayçiçeği bitkisinde farklı genotip, eksplant kaynağı ve EİO bazal ortamlarının kallus, sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranı üzerine etkileri

EİO	Genotip	Eksplant	KL.O. O. (skor)	KL O.O. EİO Ort. (skor)	S. O.O. (%)	S.O.O. EİO Ort. (%)	K. O.O. (%)	K.O.O. EİO Ort. (%)	B. O.O. (%)	B.OO EİO Ort. (%)
MWO	Pactol	Kotiledon	3.00 b	3.50 a	30.00 a	25.83 a	25 d-f	52.92 a	23.33 ab	20.83 a
		Hipokotil	4.00 a		30.00 a		56.67 c		30.00 a	
	Sirena	Kotiledon	3.00 b		20.00 bc		30.00 d		16.67 b-d	
		Hipokotil	4.00 a		23.33 ab		100.00 a		13.33 b-e	
A	Pactol	Kotiledon	3.13 b	3.17 b	20.00 bc	7.50 cd	0.00 j	0.00 e	20.00 a-c	8.33 b
		Hipokotil	4.00 a		10.00 d-f		0.00 j		13.33 b-e	
	Sirena	Kotiledon	1.53 e		0.00 g		0.00 j		0.00 f	
		Hipokotil	4.00 a		0.00 g		0.00 j		0.00 f	
B5	Pactol	Kotiledon	2.00 d	2.52 c	10.00 d-f	14.17 b	0.00 j	4.17 d	3.33 ef	6.67 bc
		Hipokotil	2.00 d		16.67 b-d		3.33 ij		10.00 c-f	
	Sirena	Kotiledon	2.10 d		20.00 bc		3.33 ij		13.33 b-e	
		Hipokotil	4.00 a		10.00 d-f		10.00 gh		0.00 f	
OBO	Pactol	Kotiledon	2.20 d	3.10 b	6.67 e-g	3.33 d	23.33 ef	43.33 b	3.33 ef	1.67 c
		Hipokotil	4.00 a		3.33 fg		60.00 bc		3.33 ef	
	Sirena	Kotiledon	2.10 d		3.33 fg		26.67 de		0.00 f	
		Hipokotil	4.00a		0.00 g		63.33 b		0.00 f	
ABO	Pactol	Kotiledon	3.00 b	3.42 a	10.00 d-f	8.33 c	6.67 hi	15.83c	13.33 b-e	7.50 b
		Hipokotil	4.00 a		6.67 e-g		20.00 f		6.67 d-f	
	Sirena	Kotiledon	2.67 c		13.33 c-e		13.33 g		10.00 c-f	
		Hipokotil	4.00 a		3.33 fg		23.33 ef		0.00 f	

EİO: Embriyo İndüksiyon Ortamı, KL.O.M.: Kallus Oluşturma Oranı, S.O.O.: Sürgün Oluşturma Oranı, K.O.O.: Kök Oluşturma Oranı, B.O.O.: Bitkicik Oluşturma Oranı, Ort.: Ortalama

Farklı bazal ortamlardan oluşan embriyo indüksiyon ortamları x genotip x eksplant interaksiyon değerlerinin kallus (skor), kök (%), sürgün (%) ve bitkicik oluşturma (%) verilerinin yer aldığı Çizelge 4.24'e göre kallus oluşturma oranı bakımından ABO ve MWO en yüksek kallus oluşturma potansiyeline sahip olurken (4 skor), B5 embriyo indüksiyon besi ortamı en düşük kallus oluşturma potansiyeline sahip olmuştur (2.52 skor). Ele alınan tüm uygulamalarda kallus oluşumu gözlenirken (1.53-4 skor), en yüksek oranda kallus oluşturma değerleri her 2 genotipin hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Sürgün, kök ve bitkicik oluşturma oranları açısından en yüksek değerler MWO'dan elde edilirken (% 25.8-52.9-20.8), OBO'dan en düşük oranda sürgün ve bitkicik oluşturma değerleri elde edilmiştir (% 3.33-1.67). A embriyo indüksiyon besi ortamında ise kök oluşumu gözlenmemiştir.

En yüksek oranda sürgün ve bitkicik oluşturma potansiyeli MWO'da Pactol genotipinden elde edilirken (% 30), yine aynı embriyo indüksiyon besi ortamında Sirena genotipinden en yüksek oranda kök oluşturma potansiyeli elde edilmiştir (% 100).

En yüksek sürgün oluşturma oranı her 2 eksplant kaynağından elde edilirken, en yüksek kök ve bitkicik oluşturma oranı yalnızca hipokotil eksplant kaynağından elde edilmiştir. Shin ve ark. (2000), ayçiçeği bitkisinde 4 farklı bazal ortamın (Anderson, B5, MS, WPM) 2 farklı eksplant tipinde (çimlenmiş tohumlardan elde edilen meristematik doku, primordiyal yapraklar) sürgün regenerasyonu geliştirme potansiyellerini karşılaştırmışlardır. Hazırladıkları bazal ortamlara 2 µM BA, % 3 sukroz ve % 0.6 agar ilave etmişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, en yüksek eksplant başına sürgün oluşturma oranını MS bazal ortamından (% 78) ve B5 bazal ortamından (% 68) elde etmişlerdir. Bazal ortamlarda kullanılan hormon ve konsantrasyonlarının, çalışmalarda kullanılan genotiplerin ve eksplant kaynaklarının aynı olmaması elde edilen sonuçların farklı olmasının olası nedenleri arasında sayılabilir.

5. SONUÇ

Bu araştırma, ayçiçeği bitkisinde bitki regenerasyonunu optimize edebilmek amacıyla 2010-2012 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi deneme alanları, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait sera ile Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı ve bu laboratuvara ait inkübasyon odasında yürütülmüştür.

Çalışmada materyal olarak 1 restorer, 2 hibrid ve 13 kendilenmiş hat, ayçiçeği genotiplerinin *in vitro* çimlendirilmiş tohumlarından sağlanan eksplant kaynakları ve olgunlaşmamış tohumlardan elde edilen olgunlaşmamış embriyo eksplantları kullanılmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

- Ayçiçeği bitkisi tohumlarında yüzey sterilizasyonu optimizasyonu ile ilgili yapılan denemeler sonucunda tohum kabukları soyularak yapılan yüzey sterilizasyonunun bulaşma oranını azaltarak çimlenme oranını arttırdığı gözlenmiştir.
- Farklı genotiplerden elde edilen farklı eksplant kaynaklarının embriyo indüksiyon besi ortamlarında gelişme sürelerinin kallus oluşturma, somatik embriyogenesis ve organogenesis elde etmede önemli bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Farklı genotiplerin olgunlaşmamış tohumlarından elde edilen olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşturma potansiyelinde genotipin önemli bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.
- Farklı hormon konsantrasyonlarını içeren embriyo indüksiyon ortamlarının 2 hibrid ayçiçeği genotipinden sağlanan hipokotil ve kotiledon eksplant kaynaklarında en yüksek oranda bitki regenerasyonu % 0.1 BA/0.1 NAA ve % 0.1 BA/1.5 NAA hormon konsantrasyonlarını içeren embriyo indüksiyon ortamlarından sağlanmıştır.
- Farklı çimlendirme sürelerinde çimlendirilmiş 2 hibrid genotipten elde edilen hipokotil ve kotiledon eksplant kaynaklarında en yüksek bitki regenerasyonu değerlerini 3 günlük çimlendirilmiş tohumların verdiği gözlenmiştir.
- İki hibrid ayçiçeği genotipinden sağlanan hipokotil ve kotiledon eksplant kaynaklarında çimlendirme ve embriyo indüksiyon besi ortamlarında, karanlık

uygulamasının bitki regenerasyonu için olumlu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

- İki hibrid ayçiçeği genotipinden sağlanan kotiledon eksplantlarının en iyi sürgün regenerasyonunu embriyo indüksiyon besi ortamına düz bir şekilde ve zedeleme yapılmadan bırakıldığında verdiği tespit edilmiştir.
- Farklı bazal ortamları içeren embriyo indüksiyon besi ortamlarında iki hibrid ayçiçeği genotipinden sağlanan kotiledon ve hipokotil eksplantlarında en yüksek oranda bitki regenerasyonu değerlerini MWO'nın verdiği belirlenmiştir.

Yürütülen bu çalışmada, genotip ve eksplant tipinin etkili bir bitki regenerasyon sistemi geliştirmede, en önemli faktör olduğu tespit edilmiş ve etkili bir regenerasyon sistemi geliştirmek için genotip ve eksplant tipine bağlı olarak optimizasyonun yapılması gerektiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda *in vitro* şartlarda organogenesis aracılığıyla regenere olan bitkicikler aklimatizasyon için toprağa aktarılmışlardır. Saksılarda yetiştirilen bitkilerde tabla ve çiçek üretimi olmuştur. Yürütülen bu çalışmada, ayçiçeğinde *in vitro* regenerasyon yöntemi ile tam bir bitki eldesi için geçen süre yaklaşık 12-13 hafta olmuştur.

KAYNAKLAR

- Abdoli, M., Moieni, A., Dehghani, H. 2003.** Effects of genotype and cotyledon section on organogenesis in sunflower. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(4): 234-238.
- Alibert, G., Aslane-Chanabe, C., Burrus, M. 1994.** Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. *Plant Physiol. Biochem.*, 32(1): 31-44.
- Anitha, V., Jabeen, F., Ansari, N.A. 2011.** *In vitro* studies in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 2(3): 320-323.
- Anonim, 2010a.** FAO, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> –(Eriřim tarihi: 21.05.2012)
- Anonim, 2010b.** T.C Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Teşkilatlandırma Genel M¼d¼rl¼ę¼ Ayçiçeği raporu 2010, pg :10
- Anonim, 2010c.** İklim verileri. <http://meteor.gov.tr/2010/kurumsal/kurumsal-birimler.aspx>-(Eriřim Tarihi: 21.05.2012)
- Anonim, 2012.** Bitki doku k¼lt¼r¼. <http://ebookbrowse.com/1099-bitki-doku-kulturu-pdf-d60157072=1099>–(Eriřim tarihi: 21.05.2012).
- Arda, H. 2004.** *In vitro* regeneration and callus formation of different hybrid of the (sunflower). *Helianthus annuus* L. Yielding in Turkish Trakya region. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(6): 747-751.
- Aurori, A.C. 2011.** Studies regarding some factors involved in sunflower protoplast and tissue explant organogenesis and somatic embryogenesis. Summary of Doctoral Thesis. Babeř-Bolyai University, Cluj-Napoca Faculty of Biology Ang Geology Department of Experimental Biology.
- Azadi, P., Moieni, A., Ahmadi, M.R. 2002.** Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. *Helia* 25(37): 19-26.
- Babaoğlu, M., G¼rel, E., Özcan, S., 2004.** Bitki Biyoteknoloęisi I, Doku K¼lt¼r¼ ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Kamp¼s¼, Rixos Otelı Giriři Yanı, Vakıf İdari Bina, Konya.
- Badea, E., Prisecaru, M., Angheluta, H. 1989.** Studies on gynogenesis in intraspecific and interspecific hybrids in the genus *Helianthus*. *Cercet. Genet. Veg. Anim.*, 1: 177-183.
- Baker, C.M., Munoz-Fernandez, N., Carter, C.D. 1999.** Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58:39-49.

Bidney, D.L., Scelonge, C.J. 1997. Sunflower biotechnology. In: sunflower technology and production. Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSSA (Eds.): 559-593.

Ceriani, M.F., Hopp, H.E., Hahne, G., Escandon A.S. 1992. Cotyledons: an explant for routine regeneration of sunflower plants. *Plant Cell Physiology*, 33; 121:157-164.

Dağüstü, N., Oğraş, T., Gözükırmızı, N. 1998. Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* rejenasyon ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen transferi. XIV Ulusal Biyoloji kongresi, 7-10 Eylül 1998, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Samsun. Cilt II, 94-103.

Dağüstü, N. 1999. Olgun zigotik embriyolardan izole edilen ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) meristemlerinde bitki rejenerasyonu. Türkiye Tarla Bitkileri Kongresi, III. 15-18 Kasım, Adana, s: 313-316.

Dağüstü, N. 2002. Some factors affecting the plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 16(1): 18-23.

Dağüstü, N., Fraser, P., Enfissi, E., Bramley, P. 2008. Screening for high callus induction and *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22(4): 933-937.

Deglène, L., Lesignes, P., Alibert G., Sarrafi, A. 1997. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48: 127-130.

Encheva, J., Tsvetkova, F., Ivanov, P. 2004. Heritable tissue culture induced genetic variation in sunflower (*helianthus annuus* L.) as a tool for crop improvement. *Helia*, 41: 163-172.

Espinasse, A., Lay, C. 1989. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes. *Crop Sci.*, 29:201-205.

Fabijan, D., Yeung, E., Mukherjee, I., Reid, D.M. 1981. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Physiol. Plant*, 53:578-588.

Fambrini, M., Cionini, G., Pugliesi, C. 1997. Acquisition of high embryogenic potential in regenerated plants of *Helianthus annuus* x *H. Tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:103-110.

Finer, J.J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose- containing medium. *Plant Cell Reports*, 6: 372-374.

Fiore, M.C., Trabace, T., Sunseri, F. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.*, 16: 295-298.

- Freyssinet, M., Freyssinet, G. 1988.** Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Sci.*, 56: 177-181.
- Gelebart, P., San, L.H. 1987.** Obtention de plantes haploïdes par culture in vitro d'ovaires et d'ovules non fécondes de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*, 7:81-86.
- George, E.F., Sherrington P.D. 1984.** Plant propagation by tissue culture. In :George, E.F.; Sherrington P.D., eds. Hants, JK:Exegetic Ltd.;184-283
- Greco, B., Tanzarella, O.A., Carrozzo, G., Blanco, A. 1984.** Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci. Lett.*, 36:73-77.
- Gürel, E., Kazan, K. 1998.** Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Tr. J. of Botany*, 22: 381-387.
- Hahne, G. 2001.** Sunflower. In: The Handbook of Transgenic Food Plant (Y.L. Hui, G. Khachatourians, A. McHughen, W.K. Nip, R. Scorza Eds.) Decker, New York., 813-831.
- Jeannin, G., Bronner, R., Hahne, G. 1995.** Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro : role of the sugar. *Plant Cell Rep.*, 15: 200-204.
- Katkat, V., Ayla, F., Güzel, İ. 1985.** Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliği Arazisinin Toprak Etüdü ve Verimlilik Durumu. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3:71-78.
- Kaya, Y. 2004.** Ayçiçeği biyoteknolojisinde son gelişmeler ve ayçiçeği ıslahında kullanım olanakları. *Trakya Univ. J Sci.*, 5(2):141-147.
- Khalid, M., Chriabi, B., Castelle, J.C., Lathe, A., Roustan, J.P., Fallot, J. 1992.** Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 10: 617-620.
- Knittel, N., Escandon, A.S., Hahne, G. 1991.** Plant generation at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Science*, 73:219-226.
- Knittel, N., Lénéé, P., Ben Tahar, S. 1992.** Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Du gène á l'entreprise, forum jeunes chercheurs, Amiens, France,122.
- Lupi, M.C., Bennici, A., Locci, F., Gennal, D. 1987.** Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,11: 47-55.
- McCann, A.W., Cooley, G., Van Dresser, J. 1988.** A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 14: 103-110.

- Monique, B., Chanabe, G., Alibert, G., Bindey, D. 1991.** Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 10: 161-166.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.
- Muhammed, A., Sarjid, M., Hussain, I., Quraishi, A. 1999.** *In vitro* morphogenesis from seeds of *Helianthus annuus*. L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2(4):1432-1434.
- Nestares, G., Zorzoli, R., Mroginski, L., Picardi, L. 1998.** Cytoplasmic effects on the regeneration ability of sunflower. *Plant Breeding*, 117:188-190.
- Nestares, G., Zorzoli, R., Mroginski, L., Picardi, L. 2002.** Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. *Plant Breeding*, 121:366-368.
- Nurhidayah, T., Horn, T., Röcher, T., Friedt, W. 1996.** High regeneration rates rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. *Plant Cell Rep.*,16: 167-173.
- Oyebanji, O.B., Nuseke O., Odebunmi, O., Galadima N.B., Idris, M.S., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S., Ogbadu, G.H. 2009.** Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5395-5399.
- Özyiğit, I.I., Gözükırmızı, N., Semiz, B.D. 2006.** Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(4): 556-559.
- Özyiğit, I.I., Gözükırmızı, N., Semiz, B.D. 2007.** Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6(13): 1498-1502.
- Paterson, K.E. 1984.** Shoot tip culture of *Helianthus annuus*-Flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Amer. J. Bot.*, 71(7): 925-931.
- Paterson, K.E., Everett, N.P. 1985.** Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Science*, 42:125-132.
- Pelissier, B., Bouchfra, O., Pepin, R., Freyssinet G. 1990.** Production of isolated somatic embryos from sunflower thin layers. *Plant Cell Rep.*, 9: 47-50.
- Power, C.J. 1987.** Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. *Amer. J. Bot.*, 74: 497-503.
- Prado, E., Berville, A. 1990.** Induction of somatic embryo development by liquid culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.*, 67: 73-82.

- Pugliesi, C., Cecconi, F., Mandolfo, A., Baroncelli, S. 1991.** Plant regeneration and genetic variability from tissue cultures of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding.*, 106: 114-121.
- Punia, M.S., Bohorova, N.E. 1992.** Callus development and plant regeneration from different explants of six wild species of sunflower (*Helianthus* L.). *Plant Science*, 87:79-83.
- Robinson, H. 1981.** A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian Contr. Bot.*, 51:1-28.
- Seiler, G.J., Rieseberg, L.H. 1997.** Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. *Sunflower technology and production, agronomy monograph no.35.*
- Shin, D.I., Kim, J.S., Kim, I.J., Yang, J., Oh, S.K., Chung, G.C., Han, K.I. 2000.** A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 36: 273-278.
- Taški-Ajduković, K.J., Vasić, D.M. 2005.** Different sterilization methods for overcoming internal bacterial infection in sunflower seeds. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad.*, 109: 59-64.
- Thengane, S.R., Joshi, M.S., Khuspe, S.S., Mascarenhas, A.F. 1994.** Anther culture in *Helianthus annuus* L. influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant Cell Rep.*, 13: 222-226.
- Thomas, C., Meyer, D., Himber, C., Steinmetz, A. 2004.** Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 35-42.
- Trabece, T., Vischi, M., Fiore, M.C., Sunseri, F., Marchetti, S., Vanadia, S., Olivieri, A.M. 1995.** Plant regeneration from hypocotyl protoplast in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.*, 49: 51-54.
- Wilcox, A., Cooley G.L. 1987.** Sunflower regeneration through organogenesis. *United States Patent 4: 670,392.*
- Wirtzens, B., Scowcroft, W.R., Downes, R.W., Larkin, P.J. 1988.** Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H.tuberosus* x *H. annuus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 13:61-76.
- Vega, T.A., Nestares, G.M., Zorzoli, R., Picardi, L. 2006.** Responsive regions for direct organogenesis in sunflower cotyledons. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(5): 427-431.

Yeoman, M.M., Forche, E. 1976. Cell proliferation and growth in callus cultures of Douglas fir, *Plant Physiology*, 57: 322

Yordanov, Y., Yordonova E., Atanassov, A. 2002. Plant regeneration from interspecific hybrid and backcross progeny of *Helianthus eggertii* x *Helianthus annuus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71:7-14.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Melek BAYRAKTAROĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa 29.07.1984

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurumu ve Yılı)

Lise : Gemlik Lisesi Y.D.A. (1998-2002)

Lisans : Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Ziraat Mühendisliği Tarla Bitkileri(2004-2009)

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı (2009-2012)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : -

İletişim (e-posta) : melekbayraktaroglu09@gmail.com

Yayımları :

- Dağüstü N., G. Bayram, M. Sincik, M. Bayraktaroğlu, 2012.** The short breeding cycle protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). IBP X Simposio Internacional De Biotecnologia Vegetal 17-19 de abril de 2012, Santa Clara Villa Clara, Cuba, pg: 74.
- Bayraktaroğlu, M., Dağüstü, N., 2011.** Ayçiçeği bitkisinde (*Helianthus annuus* L.) tohum sterilizasyon yönteminin optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Bilgilendirme ve AR-GE Günleri, 15-17 Kasım 2011, Mete Cengiz Kültür Merkezi, Bursa.
- Dağüstü, N., Bayraktaroğlu M., 2011.** Tarla bitkileri doku kültürü laboratuvarı. Uludağ Üniversitesi Bilgilendirme ve AR-GE Günleri, 15-17 Kasım 2011, Mete Cengiz Kültür Merkezi, Bursa.
- Bayraktaroğlu, M., Dağüstü, N., 2011.** Ayçiçeği Bitkisinde (*Helianthus annuus* L.) Tohum Sterilizasyon Yönteminin Optimizasyonu. IX Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Eylül 2011, Bursa.
- Bayraktaroğlu, M., Dağüstü, N., 2011.** *In vitro* regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.). International Symposium on Sunflower Genetic Resources, 16-20 October, Kuşadası, İzmir, Turkey, pg: 22.
- Dağüstü N., M. Bayraktaroğlu, Güden, B., 2011.** Establishment of apical shoot meristem culture for *in vitro* conservation of sunflower (*Helianthus annuus* L.)

genetic resources. International Symposium on Sunflower Genetic Resources 16-20 October, Kuşadası, İzmir, Turkey, pg: 19.

Bayraktaroğlu, M., Dağüstü, N., 2011. Influences of genotype and explant on callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, (Serial No.33) 5(2): 226-231.

Dağüstü, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroğlu, M., 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – Immature embryo. *Helia*, 33(52): 95-102.

Bayraktaroğlu, M., Dağüstü, N., 2010. Influences of genotype and explant on callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Sunbio 2010, 8th European Sunflower Biotechnology, 1-3 March, Antalya, Turkey, pg: 39.

Dağüstü, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroğlu, M., 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – Immature embryo, Sunbio 2010 8th European Sunflower Biotechnology, 1-3 March, Antalya, Turkey, pg: 40.