T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN MİKRO ÇOĞALTIMI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Zeliha ÇİFTÇİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN MİKRO ÇOĞALTIMI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Zeliha ÇİFTÇİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Doç. Dr. Ebru SAKAR danışmanlığında, Zeliha ÇİFTÇİ'nin hazırladığı **"Bazı Zeytin Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine Bir Araştırma"** konulu bu çalışma 26/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

imza

Danışman : Doç.Dr. Ebru SAKAR ……..

Üye : Prof. Dr. Bekir Erol AK ……...

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yusuf NİKPEYMA ……....

Bu Tezin Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. İrfan ÖZBERK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No:17180

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8
3.MATERYAL ve YÖNTEM 17
3.1.Materyal 17
3.2. Yöntem 17
3.2.1.Bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu 17
3.2.2.Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu 18
3.2.3.Kültür şartları 19
3.2.4.Boğum ve sürgün ucu eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması 20
3.2.5.Mikro sürgünlerin yaprak sayısı, bitki boyu ve çoğalma katsayısı 21
3.2.6.Mikro sürgünlerin köklendirilmesi 21
3.2.7.Dış koşullara alıştırma(aklimatizasyon) 21
3.2.8.İstatiksel değerlendirme 22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 23
4.1.Bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu 23
4.2.Boğum ve sürgün ucu eksplantlarından sürgün gelişimi ve kardeşlenme 27
4.3.Mikro sürgünlerin yaprak sayısı, bitki boyu, çoğalma katsayısı 33
4.4.Mikro sürgünlerin köklendirilmesi 35
4.5.Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması 37
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER 40
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 49

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN MİKRO ÇOĞALTIMI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Zeliha ÇİFTÇİ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru SAKAR
Yıl:2019, Sayfa:49

Bu çalışmada, Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetiştirilen "Gulleki", "Nizip Halhallı", "Gemlik", "Hursuki" ve "Arbequina" zeytin çeşitlerinin in vitro mikro çoğaltımı amaçlanmıştır. Bu çeşitlerden "Gulleki" ve "Nizip Halhallı" için uygun in vitro mikro çoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Boğum ve sürgün ucu eksplantları 1 mg/l zeatin içeren OM (olive medium) besin ortamında kültüre alınmışlardır. 1 mg/l zeatin içeren OM besin ortamında kültüre alınan "Gulleki" ve "Nizip Halhallı" çeşitlerine ait sürgün ucu eksplantlarında yüksek oranda sürgün oluşumu ve kardeşlenme sağlanmıştır. "Arbequina", "Hursuki" ve "Gemlik" çeşitlerinde çok düşük düzeyde sürgün oluşumu ve kardeşlenme olduğu gözlemlenmiştir. Bu çeşitlerden "Hursuki" çeşidinde yüksek düzeyde kontaminasyon oluşmuştur. Mikro sürgünleri köklendirmek amacıyla 4 mg/l IBA(indol butirik asit) içeren OM besin ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi köklenme %89.74 ile "Gulleki" ve % 89.06 ile "Nizip halhallı" çeşidinde olurken diğer çeşitlerde köklenme gerçekleşmemiştir. Köklü bitkiciklerin yanlızca %50'si dış koşullara alıştırılabilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin, Gulleki, Nizip halhallı, OM, Zeatin, IBA

ABSTRACT

MSc Thesis

A STUDY MİCRO PROPAGATİON OF SOME OLİVE VARİETİES

Zeliha ÇİFTÇİ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Garden Herbs

Supervisor: Assoc.Prof.Dr.Ebru SAKAR
Year:2019, Page:49

In this study, the in vitro microclimation of Anadolu Gulleki qu, “Nizip Halhallı“, ”Gemlik“, ”Hursuki ip and” Arbequina “olives grown in Southeastern Anatolia was aimed. A suitable in vitro micro replication protocol has been developed for these species 'Gulleki' and 'Nizip Halhallı'. Knuckle and shoot tip explants were cultured in OM (olive medium) nutrient medium containing 1 mg / l zeatin. A high rate of shoot formation and fraternity were obtained in the shoot tip explants of the Gulleki sür and Hal Nizip Anklet “cultivars cultivated in the OM nutrient medium containing 1 mg / l zeatin. Very low level shoot formation and sibling were observed in the “Arbequina olduğ, u Hursuki and Gemlik varieties. A high level of contamination was observed in these varieties ”Hursuki“. They were cultured in an OM nutrient medium containing 4 mg / l IBA (indole butyric acid) to render micro shoots rooted. The best rooting was Gulleki with % 89.74 and Nizip halhallı“with %89.06 and no rooting in other varieties. Only 50% of rooted plantlets could be acclimatized to external conditions.

KEY WORDS: Olive, Gulleki, Nizip halhalı, Zeatin, Olive Medium, IBA

TEŞEKKÜR

‘Bazı Zeytin Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine Bir Araştırma’ adlı çalışmada bana araştırma imkânı veren ve her aşamada desteğini esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Ebru SAKAR’a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca doku kültürü hakkında bilmem gereken her şeyi öğreten, uyarı ve eleştirileriyle bana yön vererek bu konudaki yoğun bilgi ve tecrübesiyle bana danışmanlık yapan hocam sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR’a sonsuz teşekkürler.

Ayrıca laboratuvar çalışmamda bana ev sahipliği yapan Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’ne ve çalışanları Ziraat Yük. Müh. Belgin TURUNÇ BİÇEN’e, Ziraat Yük. Müh. Hakan Mansur Erol’a, Fatma KARA’ya, Eda ARSLANKILIÇ’a yardımları ve desteklerinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Lisansüstü öğrenimim boyunca beni cesaretlendiren ve yüreklendiren aileme sonsuz teşekkürler.

‘Bazı Zeytin Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine Bir Araştırma’ adlı bu bilimsel çalışmayı başta annem olmak üzere tüm kadınlara armağan ediyorum…

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Zeytin ağacının genel görüntüsü 2
Şekil 3.1. Otoklavlanmış besin ortamı 18
Şekil 3.2. Steril kabin çalışma alanı 19
Şekil 3.3. İklim odasından bir görüntü 20
Şekil 4.1. Eksplantların saf suyla yıkanması 24
Şekil 4.2. Eksplantların tween 20 ile yıkanması....25
Şekil 4.3. Nizip halhallı çeşidi cıva klorür kullanımı durumunda oluşan bakteriler 26
Şekil 4.4.Gulleki çeşidine ait kardeşlenmiş eksplant 28
Şekil 4.5. Nizip halhallı çeşidi AC ortamında cıva klorür kullanımı durumunda oluşan bakteriler....29
Şekil 4.6. Nizip halhallı çeşidine ait sağlıklı eksplantların görünümü 29
Şekil 4.7. Hursuki çeşidinde aktif karbon kullanılmaması durumunda eksplant gelişimi....30
Şekil 4.8. Hursuki çeşidinde aktif karbon kullanımında eksplant görünümü....31
Şekil 4.9. Gemlik çeşidinin aktif karbonsuz ortamdaki eksplant görünümü....32
Şekil 4.10.Gemlik çeşidinin aktif karbon ortamındaki görünümü 32
Şekil 4.11.Gulleki çeşidine ait mikro bitkiciklerin hassas cetvel ile ölçümü 34
Şekil 4.12. Kök ortamına alınan gulleki çeşidi....35
Şekil 4.13. Gulleki çeşidine ait kökler 36
Şekil 4.14. Arbequina çeşidine ait köklenmemiş eksplant görünümü....37
Şekil 4.15. Viyollere aktarılmış mikro bitkiler....38
Şekil 4.16. Dış koşullara alıştırılan mikro bitkiler……39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Alt kültüre alınan bitki sayısı 27
Çizelge 4.2.Bitkiler için tek yönlü ANOVA tablosu.....33
Çizelge 4.3.Bitkilerin Tukey HSD çoklu karşılaştırma sonuçları…… 33
Çizelge 4.4.Mikro sürgünlere ait bazı veriler……..…… 34

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BA	6-Benziladenin
CM	Santimetre
GA_3	Giberellik asit
G	Gram
IBA	İndol Butirik Asit
L	Litre
MG	Miligram
ML	Mililitre
MS	Mursahige ve Skoog
NAA	Naftalen Asetik Asit
NaOCI	Sodyum Hipoklorit
OM	Olive Medium
TDZ	Tidiazuron

1.GİRİŞ

Zeytin Oleaceae familyasının Olea cinsine dahil bir meyve türüdür (Flahault, 1986; Moretteni, 1972). Olea cinsi çok sayıda tür ve alt türleri içermekte olup, bunların çoğu çalı formundadır. Ekonomik değeri en yüksek olan tür Olea europaea'dır (Baldoni et al., 2006). Bu tür 0. europaea var. sylvestris ve O. europaea var. sativa adlı iki ana gruba bölünmüştür. Bunlardan birincisi yabani zeytinler olarak tanımlanan bütün tipleri, ikincisi ise kültür zeytinlerini içermektedir (Turrill, 1951). Kültür ve yabani zeytin genotipleri aynı kromozom sayısına (2n=46) sahiptir (Green ve Wickens 1989).

Bazı araştırıcılar ise O. Europaea türünün morfolojik ve coğrafi dağılımına göre 6 alt türü olduğunu bildirmişlerdir. Bu alt türler;

1) O. europaea subsp. europaea, Akdeniz Bölgesi kültür ve yabani zeytini

2) O. europaea subsp. cuspidata, Güneydoğu Asya, Güneybatı Çin, Arabistan, Doğu ve Güney Afrika

3) O. europaea subsp. laperrinei, Sahra bölgesi

4) O. europaea subsp. maroccana, Fas

5) O. europaea subsp. cerasiformis, Madeira Adası

6) O. europaea subsp. guanchica, Kanarya Adaları olarak sınıflandırılmıştır (Green ve Wickens, 1989; Gren, 2002).

Zeytinin kültüre alınışı 5500 yıl önce "Oleaster" olarak adlandırılan yabani Akdeniz zeytininin, Avrupa'nın güneyi ve Afrika'nın kuzeyinde görülen insan göçlerini takip ederek başladığı tahmin edilmektedir (Besnard ve ark., 2001). Zeytin, M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'in doğu kıyılarında kültüre alınmaya başlamış ve Akdeniz bölgesinde kültüre alınan ilk meyve türlerindendir (Zohary ve Spiegel-Roy, 1975). Bugüne kadar yapılan arkeolojik çalışmalardan elde edilen bulgular, zeytin yetiştiriciliğinin kökeninin Suriye-İsrail-Filistin bölgesi olduğuna işaret etmektedir (Zohary ve Hopf, 1993; Remesal- Rodríguez, 1996).

Zeytin, dünyanın belirli bölgelerinde ekolojik açıdan kendine uygun yaşam alanları bulmuştur. Genel olarak Kuzey ve Güney yarım kürenin 30°-45° enlemleri arasındaki bölge zeytinin üretim kuşağı olarak nitelendirilmektedir (Rallo ve ark., 1997). Ekonomik olarak 38 ülkede zeytin üretimi yapılmakta ve bu ülkelerin 30'u kuzey yarım kürede, 8'i ise güney yarım kürede bulunmaktadır (Öztürk, 2006). Kuzey yarım kürede bulunan üretim alanları Akdeniz Havzası'nda yoğunlaşmış olup dünya zeytin üretiminin % 99'unu karşılamaktadır. Bu açıdan, zeytin, Akdeniz ülkelerinin ekonomisinde, beslenmesinde ve kültüründe önemli bir yere sahiptir (Zamora ve ark., 2001). Dünyada geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmakta olan zeytin türünün, 2000'den çok çeşide sahip olduğu bildirilmiştir (Bartolini ve ark., 1998). Ancak, yerel çeşitler hakkında bilgi eksikliği nedeniyle bu sayının düşük olduğu söylenmektedir (Cantini ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Zeytin ağacının genel görüntüsü(Anonim)

Şu anda zeytin yetiştiriciliği yapan ülkelerin çoğunda zeytin, yapraklı gövde veya çeliklerin köklendirilmesiyle veya gövde filizlerinin, tohumdan gelişen ya da klonal gövdelere aşılanmasıyla çoğaltımı sağlanmaktadır (Fabbri ve ark., 2004). 1950 yıllarının ortalarında çelikle çoğaltım tekniği özellikle İspanya gibi aşılama yönteminin kullanılmadığı ülkelerde yaygınlaşmış olup üretim materyalinin %70'ten fazlasının kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bununla beraber, sofralık zeytin olarak adlandırılan çeşitlerin köklenmesi çok zor veya tamamen imkansızdır. Ayrıca, de novo olarak oluşan kökler sıklıkla işlevsel değildir. Bu sebeble genotiplerin klonal çoğaltımı amacıyla aşılama en uygulanabilir yöntem olarak görülmektedir. Günümüze kadar, morfolojik açıdan, yüksek derecede benzer olmayan binlerce zeytin genotipi kültüre alınmıştır. Bununla birlikte, bu çeşitlerin üretiminin gelecekte devamlılığını sağlamak için yapılan uygulamaları sınırlayıcı bazı problemlerin (verimliliğin düşük, üretim maliyetinin fazla olması gibi) çözülmesi gereklidir. (Rugini ve Caricato, 1995).

Köklenmesi çok zor olan zeytinin ürün verimliliğinin arttırılması amacıyla, geleneksel yöntemlerin, kısa zamanda ve kolay bir şekilde ticari olarak yüksek miktarlarda bitkinin çoğaltılmasını sağlayan mikro çoğaltım yöntemi gibi biyoteknolojik yaklaşımlarla desteklenmesi gerekmektedir. Şimdiye kadar pek çok meyve türü doku kültürü yöntemleri kullanılarak in vitro çoğaltılmış ve aynı zamanda bazı zeytin çeşitlerinin mikro çoğaltım yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltılması sağlanmıştır (Rugini ve Fedeli, 1990).

Zeytinde klasik ıslah çalışmaları, zeytin ağacının uzun süren olgunlaşma evresi, zor meyve tutumu, heterozigotluk oranlarının fazla oluşu ve düzensiz tohum çimlenme oranları nedeniyle önemli ölçüde başarılı olamamıştır. Ayrıca zeytinde olgunlaşma evresinin uzun oluşu ve segregasyon yoluyla özellik kayıpları yaşanması nedeniyle tohumdan fidan eldesi tercih edilen bir üretim şekli değildir(Acebedo ve ark., 1997).

Yaygın olarak kullanılan çelikleme yoluyla üretimde ise genellikle tek bir bireyin klonları oluşturularak genetik çeşitlilik azalmaktadır. Bu durum ekolojide

genetik erozyon olarak nitelendirilmekte ve genetik yapıları tamamıyla aynı olan bireyleri çeşitli hastalıklar karşısında korunaksız hale getirmektedir. Bu nedenle etkili mikro çoğaltım tekniklerinin geliştirilmesi, somaklonal değişikliklerin seçilimine de olanak sağladığından zeytin çeşitlerinin sağlıklı bir biçimde çoğaltılması için önem taşımaktadır. Ayrıca bazı çeşitlerde çeliklemeyle çoğaltımda yaşanan köklenme sorunlarının aşılmasında da in vitro mikro çoğaltım teknikleri kullanılmaktadır (Qrunfleh ve ark., 1994).

Son otuz yıllık bir zaman içerisinde zeytin için birkaç farklı in vitro çoğaltım tekniği geliştirilmiştir. Doğrudan organogenezle çoğaltım gerçekleştirilen ilk mikro çoğaltım denemesidir. Bu yolla çoğaltım için olgun zeytin tohumları içindeki mineral elementler incelenerek Rugini tarafından OM adı verilen zeytine özel bir doku kültürü ortamı geliştirilmiştir ve bu ortam günümüzde de çeşitli araştırmacılar tarafından başarıyla kullanılmaktadır. Çoğaltım için kullanılan en yaygın eksplantlar ise nodal segmentler ve çenek boğumlarıdır. Ancak yapılan ilk çalışmalarda zeytinde apikal baskınlığın çok yüksek olduğu ve meristem dokuların yalnızca bir sürgün verme eğiliminde oldukları gözlenmiştir(Rugini ve ark., 1993).

Zeytin mikro çoğaltımında yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem de somatik embriyogenezdir. Somatik embriyogenez BBD'lerin yardımıyla tek veya bir grup somatik hücreden bir bitki embriyosunun oluşumuna dayalı bir mikro çoğaltım tekniğidir. Bu yolla oluşa embriyoların endospermleri veya tohum kılıfları bulunmaz ancak uygun koşullarda çimlenme kapasitesine sahiptirler. Zeytinde çenek dokuları, olgun ve olgunlaşmamış embriyo, yaprak, kök gibi çok farklı dokulardan farklı çeşitler için embriyogenez gerçekleştirilmiştir(Rugini, 1988, Mitrakos ve ark., 1992, Leva ve ark., 1995, Shibli ve ark., 2001, Cerezo ve ark., 2011). Gerçekleştirilen bir çalışmada OM ortamına organik ve inorganik azotlu bileşenlerin eklenmesinin embrogenez verimini arttırdığı da gözlenmiştir(Trabelsi ve ark., 2011).

Zeytin bitkisinin mikro çoğaltımı ile ilgili ilk bilgiler 1970'li yılların ortalarına denk gelmektedir ve bu da zeytin çeşitlerinin tamamında uygulanabilecek bir mikro çoğaltım yönteminin oluşturulması amacıyla araştırma yapan kişilerin besin

ortamının mineral madde bakımından içeriklerinin optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmalardan ibarettir. Fiorino ve Leva (1986) tarafından standart MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamının değiştirilmesiyle MSI ve Leva ve ark., (1992) tarafından belirlenen yine standart MS besi ortamının modifiye şekli olan MSM ve Rugini (1984) tarafından belirlenen OM besi yerleri, zeytin mikro çoğaltımı amacıyla kullanılan en yaygın besi ortamlarıdır. OM besi yeri, İtalya'da 50 üzerinde zeytin genotipinin in vitro şartlarda ticari olarak üretilmesinde kullanılmaktadır aynı zamanda yüksek kalitede üretim ve hızlı bitki gelişimi sağlamıştır (Rugini ve ark., 2006).

Zeytin mikro çoğaltımında sürgün eldesi için en yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi (BBD), çok yüksek yoğunlukta kullanılması gereken zeatindir ve günümüzde OM ortamıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Mendoza de-Gyves., 2008). Bu bitki büyüme düzenleyicisi çok istenmeyen şekilde sürgün tabanında büyük çaplı kallus oluşumuna neden olur(Mencuccini, M., 2003). Doku kültürüyle daha verimli sürgün eldesi için denenen diğer bir büyüme düzenleyicisi de dikegulaktır. Bu düzenleyici denenen beş çeşitten üçünde sürgün oluşumu sağlamıştır(Mendoza de-Gyves., 2008).

Temel mineral içeriğine ek olarak bitki büyüme düzenleyicileri, in vitro kültür ortamında bir besi ortamının en önemli bileşenlerini oluşturmaktadır. Zeytine ait farklı çeşitlerde yapılan çalışmalarda, besi ortamına ilave edilen 6-benziladenin (BA), tidiazuron (TDZ) ve kinetin gibi yapay bitki büyüme düzenleyicilerinin zeytinde kısa gövdelerin ve fazla bazal kallusun oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (Rugini, 1990). Doğal bir sitokinin olan zeatin ise Rugini'nin (1984) ilk çalışmasından bugüne kadar zeytin kültür besi ortamlarında yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Yüksek derecede çoğalma elde etmek amacıyla besi ortamında bu bitki büyüme düzenleyicisinin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının gerekli olduğu rapor edilmiştir. Zeatinin pahalı oluşu zeytinin in vitro çoğaltımının üretim maliyetini arttırmaktadır (Rugini ve Baldoni, 2004).

Zeytin, in vitro şartlar altında çoğaltıldığında çok güçlü bir apikal dominans göstermektedir. Bunun sonucunda, genellikle, gövde gelişimi tepe tomurcukları yerine, uzayan gövdelerden alınan bir ya da iki nodlu parçalar ile olmaktadır. Zeytin çeşidine bağlı olarak, çoğalma besi ortamındaki zeatin konsantrasyonu 0,5 mg/l ile 10 mg/l arasında farklılık gösterebilmektedir. Yarı katı besi yeri sistemlerinde, farklı bitki büyüme hormonlarının kullanılmasında karşılaşılan problemler, verim ve ekonomik açıdan zeytin mikro çoğaltımı için sıvı besi yeri kullanımını ve biyoreaktör sistemleri gibi yarı veya tam otomize dizayn edilmiş yeni teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. TIS (geçici daldırma biyoreaktör) sistemi kullanılarak, zeytin bitkisinin "Canino", "Ascolana Tenera" ve "Gentile di Larino" çeşitlerinde in vitro çoğaltımın arttığı rapor edilmiştir (Lambardi ve ark., 2006).

Zeytin mikro çoğaltımını etkileyen önemli besi yeri bileşenlerinden biri de enerji kaynağı olan karbondur. Zeytin mikro çoğaltım besi yerine sukrozla beraber mannitolün ilave edilmesinin üretim maliyetini arttırmasına rağmen proliferasyonu arttırdığı rapor edilmiştir (Leva ve ark., 1992). Benzer olarak besi ortamına ilave edilen demir pek çok enzimatik ve metabolik işlemlerde rol oynadığından ve de novo meristem organizasyonunda veya gövde gelişmesinde görevli olduğundan, besi yerindeki miktarının optimizasyonu önemlidir. Kültür koşullarını iyileştirmek amacıyla yapılan tüm bu çalışmalar sadece bazı çeşitlerle sınırlı kalmıştır ve henüz zeytin çeşitlerinin tamamı üzerinde uygulanmamıştır (Tsao ve Reed, 2002). "Manzanillo" genotipinde yapılan bir çalışmada, mannitol kullanımının sürgün uzunluğunda arttırdığı ve apikal dominansın kırılmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. Mannitole ilave olarak, yapılan in vitro çalışmalarda birkaç alt kültür sonrası besi ortamına FeEDDHA' nın ilave edilmesinin tomurcuk gelişimini ve bu tomurcuklardan gelişen gövdelerin aynı besi ortamında proliferasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. (Garcia-Ferriz ve ark., 2002)

Zeytin bitkisine ait in vitro köklenme çalışmalarında ise % 85'e varan başarı elde edildiği rapor edilmiştir (Rugini, 1984). Köklenme araştırmalarında genellikle 1-4 mg\l indol-3-butirik asit (IBA) veya α-naftalen asetik asit (NAA) kullanılmıştır. Ayrıca steril siyah renkte poli karbonat taneciklerle besi yerinin yüzeyini ya da siyah

boya ile besi ortamının kabını boyamanın da köklenme oranına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Rugini ve ark., 1993; Mencucci, 2003).

Mikro çoğaltım yöntemine ilave olarak, mikro aşılama yöntemi de zeytin bitkisinin üretiminde kullanılan biyoteknolojik yollardan bir diğeridir. İn vitro proliferasyon anaç fideler üzerine gövdelerin mikro aşılaması yöntemiyle gerçekleştirilen mikro çoğaltım bazı araştırıcılar tarafından yayınlanmıştır (Revilla ve ark., 1996; Farahani ve ark., 2006). Trancoso ve ark., (1999) tarafından yapılan başka bir çalışmada "Arbequina" genotipine ait in vitro fideler üstüne aşılanan "Canivano" genotipne ait gövdelerden in vivo'da % 67 canlılık ve verimlilik elde edildiği rapor edilmiştir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Orinos (1991), Distal ve proksimal kotiledon segmentlerinden ve olgun yabani zeytin zigotik köklerinden embriyolar elde edilmiştir. Alt periyodu boyunca, 2-30 günlük süreçte, ilk ve somatik embriyogenez boyunca rhizogenez hakim olmuştur. Düşük rhizogenezis, IBA (0.5 ve 2.5/µm) ve 5.0/µm 2iP kullanımı ile güçlendirilmiştir. Rhizogenez, ortam tuz kontrasyonlarının yarıya kadar azaltılmasıyla ve 21 günlük karanlık periyodun uygulanmasıyla ayrıca güçlendirilmiştir. Somatik embriyogenez, hem 2iP hem de IBA 5.0/µm'den fazla kullanıldığında inhibe olmuş fakat tuz konsantrasyonlarının düşürülmesinden veya karanlık periyodun kullanılmasından etkilenmemiştir.

García-Férriz (2002), bu çalışmada zeytin ağaçlarını çoğaltmak için yetişkin ağaçlardan, geniş ölçekli in vitro çoğaltma yapabilmek amacıyla bir yöntem geliştirilmiştir. Çoğaltma koşullarını belirleyebilmek için 2 ortam ve birkaç sitokin konsantrasyonu denenmiştir. En iyi sonuçlar ROM ortamı kullanıldığında alınmıştır. Tüm konsantrasyonlardaki tüm denemelerde; 6-benzilaminopurinin (BAP) Thidiazuron (TDZ) ile birlikte kullanılması, yalnızca BAP kullanımına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. 5 uM BAP konsantrasyonu aşırı gelmiş ve sürgünlerin ölümüne sebep olmuştur. Sürgünler 45 mm uzunluğa ulaştığında, önce %5 sukroz, 3 mg/l AIB ve 2 mg/l içeren steril olmayan bir çözeltiye AIA, daha sonra bir substratta transplante edilmiş ve % 100 nispi nemde tutulmuştur. Sürgünlerin %75'i transfer edildikten 25-35 gün sonra kökler üretmiştir. İklime alıştırma ise hastalık problemleri olmaksızın 55 gün devam etmiştir. 1 aylık iklimlendirme sonrasında bitkiler RAPD ile analiz edilmiş, doğru tip oldukları gösterilmiştir. Bu prosedür daha önceden seçilen Olea europea L. Ağaçlarının olası yüksek verimli mikro çoğaltma yapmaları için üreticilere uygun olduğunu göstermiştir.

Zuccherelli (2002), Zeytindeki mikro çoğaltım henüz yüksek maliyet gerektiren sistemler (köklü kesimler, aşılama) nedeniyle geleneksel çoğaltımın yerini almamıştır. Belirli türlerin özellikleri ve kitle ölçekli zeytinin mikro çoğaltılması,

protokollerin ve adaptasyonun optimizasyonunu gerektirir. Bu çalışmanın amacı, Akdeniz'de yetişen en ilginç 50 tür zeytinin mikro çoğaltımını araştırmaktır. Araştırmacı bu çalışmada mevcut protokolleri daha optimal hale getirmek için modifiye etmiştir. Zuccherelli'ye göre çalışmanın en kritik fazı in vitro adaptasyonunun ilk aşamasıydı ki bu aşamada aksiller tomurcukların emisyonunu arttırmak için oksin ile sitokininler arasındaki optimal dengeyi bulmak gerekmekteydi. In vitro davranışlarına göre kültivarları 3 ana zorluk seviyesine ayırmış; Leccino ve Picholine gibi in vitroya karşı zor grup, Pendolino ve Frantoio gibi bir orta zorluk seviyesi ve Arbequina, Barnea ve Hojiblanca gibi kolayca adapte edilebilir çeşitler. Mikro çoğaltım; kolay ve orta zorluktaki gruplar için, geniş ölçekli kullanılan ticari nursery tekniklerine karşı iyi bir alternatif olabilir. Adaptasyona karşı, zor çeşitler için ise tekniğin daha da optimize edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Maalej (2002), Tunus'ta birçok Akdeniz ülkesinde olduğu gibi zeytin yetiştiriciliği stratejik bir öneme sahiptir ve özellikle güney bölgelerdeki en fakir toprakların bile değerlendirilebilmesini mümkün kılmaktadır. Mevcut çalışmada, en önemli 2 tür olan Sfax ve Chemlali kullanılmıştır. Callogenesis, birçok doku türünden kolaylıkla başlatılmıştır, örneğin; genç veya yaşlı ağaçlarda alınan eksplantların hiçbiri somatik indüksiyon göstermemiştir. Dahası genç somatik embriyolar tam olarak çiçek açtıktan sonra 20, 30, 40 ve 120. günlerde toplanmış ve embriyonik kapasiteleri yönünden test edilmişlerdir. Embriyolar MS ortamında 6 hafta boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 16 saatlik fotoperiyotlara geçilmiş ve 2 ay bu durum devam ettirilmiştir. Düşük sitokinin konsantrasyonunu veya NAA kombinasyonunu içeren ortam ve 2iP, bazı durumlarda % 30 ulaşan bir oran ile 70 günlük zigotik embriyolarda somatik embriyogenez gözlenmiştir. Aktif kömür kullanımının, olgunlaşmamış somatik embriyoların embriyonik kapasitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Lucchesini (2002), Transplantasyon öncesi son aşamadaki zeytin bitkiciklerinin (cv. Frantoio) in vitro kültürü araştırılmıştır. Zeytin bitkileri yıllarca Rugini'ye göre çoğaltılmıştır (Rugini 1984). Bu araştırmada, koşullandırma sırasında

hava geçirgen membran kapaklı ve hava geçirmeyen geleneksel kapaklı olmak üzere 2 tip kapatma cihazı karşılaştırılmıştır. Agarize ve kumlu olmak üzere her iki köklendirme ortamı da karşılaştırılmıştır. Köklendirme ortamlarının her ikisinde de 25 g/1 manitol, 0,5 mg /1 αnaphthatenetikle 1/2 OM mineral çözeltisi asit (NAA) ve 160 mg/l putrescine dihidroklorür kullanılmıştır. Zeytinin hem morfo genetik kabiliyeti hem de mikro kesimlerinin köklenmesi kullanılan kültür kaplarından etkilenmiştir. Her iki kültürdeki farklı fotosentetik aktivite, CO2 tüketimleri üzerinden gözlenmiştir. Kültivardaki zeytin eksplantları; her iki kültürde de büyümelerine rağmen, hava alan membran kapaklı kültürde daha fazla büyümüşlerdir. Geçirgen, membranlı kapak kullanımı; transplantasyondan doğan strese rağmen güçlü bitkiler elde etmeyi sağlamıştır.

Chaari ve ark. (2002), Bu araştırmada Tunuslu Meski zeytin ağacının kabiliyetlerini araştırmıştır. Aksiller bitkisel ifadeyi geliştirmek için, nodal eksplantlar Zeatin, Ba, Kin ve glutamin, glisin ve Inositol gibi çeşitli büyüme maddeleri içeren OM kültür ortamına transfer edilmiştir. Mannitol, glukoz ve sakaroz eklenmiş; ağar (8 g/L) ile katılaştırılmıştır. Ayrıca i-OM ve Briccol-West ortamı ile NAA (1 mg/L) ve IBA (1 mg/L) eklenmiş Lombardo ortamı karşılaştırılmıştır. Sonuçlar 1 mg/l zeatin içeren OM ortamında 75 günde sürgünlerin 17 cm uzama sağladığını göstermiştir. İn vitro kültürdeki sürgünler IBA solüsyonuna daldırmadan önce %100 köklenme sağlamak amacıyla 3 g/l aktif kömürün ortama eklediklerini belirtmişlerdir.

El Bahri Trabelsi ve ark. (2003), ‘Üç zeytin çeşidinin somatik embriyogenesis aracılığıyla in vitro rejenerasyonu’ adlı çalışmada 'Chetoui', 'Chemleli' ve 'Arbequina' çeşitlerinin kotiledon segmentlerinden somatik embriyogenesisi başlatmışlar. IBA ve 2i-P içeren OMc ortamı kullanılmış ve en iyi başarı sıfır veya düşük konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarla elde edilmiştir. Yüksek hormon seviyeleri (yani,> 0.5 mg/l IBA ve 2i-P) embriyojenezi engellemiştir. Bu seviyelerde sürekli olgunlaşan ikincil embriyogenez ile farklı olgunlaşma aşamalarında embriyolar gözlenmiştir. Dört hafta, oksin içeren ortamda embriyojenez optimum seviyede olmuştur. Ek olarak, 30 ila 40 g/1 sukroz, somatik

embriyoların büyümesini ve olgunlaşmasını uyarmada glikozdan daha etkili olmuştur. Çok değişkenli nitrojen kaynakları (inorganik ve organik azot formları) kombinasyonları kullanıldığında embriyojenik verimin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sghir ve ark. (2005), yapılan çalışmalarda, Fas ve Fransız zeytinlerinin özellikleri, çeşitli yönlerden (Olea Europea L.) in vitro kültür çalışılarak karşılaştırılmıştır. Geçmişte Haouzia çeşidinin kültivar özelliğinin daha iyi olduğu, daha kolay çoğaltılmasıyla açıkça gözlenmiştir. Özellikle kültivar çalışmalarında en iyi yanıt, özellikle geçen zaman (eksplant inokülasyonu ile eksplantların %50'sinin büyümesi arasındaki birincil çekim ve çarpma oranı yani gecikme fazı) göz önünde bulundurulduğunda ZR üretim ile alınmıştır. Araştırmacı BA veya BA ile NAA'NIN kombine edildiği kültürlerde, aksiller tomurcuklanmayı ve internod sayısını arttırmadan büyümeyi geliştirdiğini gözlemlemiştir. Tüm çeşitler için in vitro edilen filizlerdeki en iyi köklenme oranı; karanlık IBA indüksiyonu ile elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ise şöyledir: 6-benziladenin (BA), indol-3-bütirik asit (IBA), alfa naftalen asetik asit (NAA), zeatin riboside (ZR).

Denaxa (2011), 2008 yılının yaz ve sonbahar mevsimlerinde köklendirme deneyleri yürütülmüştür. Farklı köklendirme ortamlarının (organik ve turba karışımı:perlit, 1:1) etkileri; IBA ve NAA hormanlarının dört farklı dozda kullanımlarının (500, 1000, 2000, 4000 ppm) ve kombinasyonlarının köklendirme yeteneği üzerine etkileri; 3 farklı ağaç türü üzerinde (Arbequina, Kalamata ve Mastoidis) karşılaştırılarak incelenmiştir. Kesim tabanlarının nişaşta ve şeker analizleri; bir sis yapma sisteminin altına konularak 3 e 7. günlerde incelenmiştir. Sonuçlar 3 kültivarın da organik substratlarda daha iyi köklendiğini göstermiştir. En iyi kök kesim (cutting) sonucunu Arbequine (%96) vermiştir. Arbequine'yı Mastoidis (%60) ve Kalamata (%2-%5) takip etmiştir. Hormon tedavisi türlerin köklenme yeteneklerini farklı etkilemiştir; Arbequina en iyi köklenme yeteneğine sahip olmuştur. (Yaz aylarında 2000 ppm IBA , sonbaharda ise 1000 ppm IBA, 1000 ppm NAA ile). Mastoidis'in en iyi sonuçları her iki mevsimde de 500 ppm IBA ile elde edilmiştir. Kalamata'da en fazla yaz ayların %5 köklenmiştir. Arbenquina'nın

birim miktarda diğer türlerden daha fazla stachyoze, mannital ve toplam çözünebilir şekere sahipken Kalamata'nın diğer türlerden daha fazla nişastaya sahip olduğu tespit edilmiştir. Kültivarların şeker konsantrasyonları dikimlerinden 3 ve 7 gün sonra her bir türde farklılıklar göstermiştir. Başlangıçtaki iç şeker miktarları ve metabolizmaları köklenmenin erken dönemleri için önemli olabildiği kaydedilmiştir.

Boustany ve ark. (2009), Bu çalışmada zeytinin (*Olea europea L.*) yerel genetik kaynaklarını korumak için 2 farklı teknik kullanmıştır: Bchealehs milenyum ağaçlarının aksiller tomurcuklarının hem in vivo hem de in vitroda çoğaltımını amaçlamıştır. Ek olarak IOC ticaret standartlarında yer alan kayıtlı sonuçlar ve milenyum ağaçlarının üretilen ekstra saf yağların bilgileri de gözetilerek zeytinyağı parametreleri de çalışılmıştır. Yeni üretilmiş eksplantların enfeksiyonunun engellenmesi için çoğaltma teknikleri ile bir dizi bir dizi aşama uygulanmıştır. En iyi hayatta kalma oranı şu kimyasalların kullanılmasıyla sağlanmıştır ; (% 56,7) in vitro veren uygun tedavi fungisitler olarak Karbendazim (2g/l) ve fosetil alüminyum (6g/l), NaOCI (% 15) ve Kloroksilenol (% 2,5) deterjan olarak ve bir antibiyotik olan oksitetrasiklin (1mg/l) . Daha sonra Eksplantlar, BAP (2, 3 ve 4) ile desteklenen MS, OM ve WPM üzerindeki genç yıllık sürgünlerden in vitro başlatılmıştır. Sonbahar, MS ortamıyla elde edilen OM ve WPM ile en yüksek proliferasyon oranı (% 47), yeni geliştirilen eksplantlar (1,35) ve çoğaltma oranı (1,08) elde edilmiştir. Ayrıca eklenen MS ortamındaki (3mg/L BAP ekleşmiş) ilk alt kültürde yeni geliştirilen yaprakların sayısı (3,58) ve en uzun eksplantlar (1,78 cm) gözlenmiştir. Alt kültür sırasında incelenen parametrelerde düşüşler gözlenmiştir. Uzama fazından sonra ise, 2mg/L NAA eklenmiş MS ortamında en yüksek köklenme (%22) vermiştir. Sonbahar boyunca üzerinde kallus gelişen eksplantlar herhangi bir alt kültür kullanılmadan %23'lük köklenme sağlayan taze besi yerine aktarılmıştır. Bchealehs kesimlerinin in vivo köklenme kabiliyeti kesim büyüklüğü, toplama mevsimi ve kullanılan ortamdan etkilenmiştir. Ortaya çıkan tomurcukların en yüksek yüzdesi (%88) ilkbahar 2010'da kaydedilmiştir. Bchealeh kesimi 2010 yılında% 10,67 iken, bu miktar 2009'da % 4'ü geçmemiştir.

Özden ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise "Edremit" yağlık genotipine ait yaşlı ağaçlardan alınan nodal tomurcukları in vitro çoğaltım amacıyla farklı karbon kaynakları (sukroz, mannitol, glukoz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (zeatin ve dikegulak) ilave edilerek hem yarı katı hem de geçici daldırma biyoreaktör olan TIS sisteminde çoğaltılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mannitol içeren sıvı OM besi ortamında TIS sistemi ile gövdelerde apikal dominansın kırılıp yanal gövdelerin gelişme gösterdiğini ve çoklu gövde oluşumunun gerçekleştirdiğini göstermiştir. Yine TIS sisteminde(geçici daldırma biyoreaktör) besi yerine zeatine ilave olarak, dikegulak eklenmesinin çoklu gövde oluşumu üzerine olumlu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, zeytin bitkisine ait nodal eksplantlardan en fazla gövde rejenerasyonu ve çoklu gövde oluşumu mannitol, zeatin ve dikegulak içeren sıvı besi ortamında TIS sistemi kullanılarak elde edildiği rapor edilmiştir.

Chaarı RKHIS ve ark. (2010), bu çalışma Oueslati çeşidine odaklanarak, zeytin ağaçlarının mikro çoğaltımı için etkin in vitro protokollerin sürekli araştırılmasına katkıda bulunmak amacıyla yapılmıştır. Bu mikro çoğaltımda, ortam bileşimi, büyüme regülatörleri, köklenme ve iklimlendirme koşullarını etkileyen faktörler incelenmiştir. Belirli koşullar altında Oueslati çeşidinin çoğalma kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çoğalma aşamasında, Rugini ortamının zeatin (1 ve 2 mg/1) ile modifiye edilmesi sonucu en yüksek çoğalma oluşmuştur. Ayrıca, bazal kısım IBA çözeltisine daldırılmış ve aynı büyüme düzenleyicisi ile zenginleştirilmiş bir agar ortamına aktarılmıştır 40 gün sonunda sürgünlerin %91'inin köklendiği kayıt altına alınmıştır. İn vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması sera koşullarında gerçekleştirilmiştir ve 4 aylık ex vitro koşullardan sonra yaklaşık % 88'lik bir başarı oranı elde edilmiştir.

Farahani ve ark. (2011), bu çalışmada, İran'da zeytin sürgünlerinin (Zard) filizlenmesi ve mikro çoğaltılması için bir protokol geliştirmeyi amaçladı çünkü bu zeytin çeşidinin (Zard) çoğaltımı zordu. Üç haftalık fideler anaç olarak kullanıldı. Zeytin (Zard) ana bitkilerinden alınan yanal meristemler (1 ila 1.5 cm uzunluğunda) kesilmiş ve Zeatin içeren OM besin ortamında sağlıklı zeytin fideleri üzerine

mikrograflar kesilmiştir. Aşılamadan 7 ila 10 gün sonra kallus oluşumu gözlenmiş ve greftlemeden 15 gün sonra güçlü bir birlik oluştuğu gözlemlenmiştir. Mikrograflı bitkilerin hayatta kalması, özellikle mikrografların üçüncü fazından sonra her zaman yüksek olmuştur. Bu eksplantlardan rejenere edilen sürgünler, çoğaldıkları 2ip içeren OM ortamına aktarılmıştır. Altı haftada bir üst tomurcuklanan bitkicikler tek-tomurcuk eksplantlarında kesilmiş ve mikro çoğaltma oranı 1:4 ile ekili bitkilerde yeniden geliştirildikleri yeni ortamlara aktarılmıştır.

Naija ve ark. (2011), Zeytinin (Olea Europia L.) somatik embriyogenezi "Chetoui" hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak çalışmıştır. İşlem olgun yapraklardan elde edilen "Calli" den başlatılmıştır. Calli, karanlıkta 10 µm NAA ve 2.25 µm 2i-P içeren yarı-kuvvetli MS ortamında başlatılmıştır. Hücre çoğalmasını belirlemek, somatik embriyogenezis indüksiyonu ve farklılaşmasını gözlemlemek için üç bitki büyüme düzenleyicisinin kombinasyonları (2,4-D, NAA ve zeatin) kullanılmıştır. Embriyonik süspansiyon için 2.5 µm 2,4-D ve 2.5 µm zeatin içeren OM kullanılmıştır. Olgun zeytin dokusundan pro globüler ve globüler embriyolar elde edilmiştir. Ek olarak hücre büyümesi ve çoğalmasını geliştirmek için inorganik olarak nitrojen formu (indirgenmiştir; (NH4) 2SO4 veya oksitlenmiş; KNO3) ve organik (CH) ayrı ayrı veya birlikte geliştirmek için kombinasyon halinde kullanılmıştır. En etkili büyüme, ortamı ve hücre proliferasyonu; inorganik ve organik azot formları içeren ortamda elde edilmiştir.

Vidoy-Mercado ve ark. (2012), bu çalışmada Arbequina çeşidinin olgun zeytin ağaçlarının ((Olea europaea L.) nodal segmentlerinden elde edilen nod bitkileri başarıyla mikrografte edilmiştir. (5 defaya kadar) In vitroda sürgünlerin köklenme yetenekleri arttırılmıştır. İlk köklü bilgiler öncelikle plastik tünel altında alıştırılıp, daha sonra seraya transfer edilmiştir. Mikro çoğaltılmış bitkiler kullanıldıktan sonra SSRs tekniğiyle analiz edildiler. Elde edilen başarı %92 oranındaydı. Bu çalışmada mikrografte bitkilerin yetişkin materyalden yeniden canlandırılabileceği gösterilmiştir.

Mangal ve ark. (2013), Nodal segmentlerden verimli ve tekrarlanabilir bitki rejenerasyonu için, "Frontio" çeşidi için protokol geliştirmiştir. Protokolde eksplantlardan alınan fenoliklerin oluşumuna bağlı esmerleşme meydana geldiği için 100 mg/l askorbik asit içeren ortam kullanmıştır. Zeytin eksplantlarının en iyi oluşumu, 1/2 MS ortamında gözlenmiştir. 2 mg/l 6-benzilaminopürin (BAP) eklenmesi; %56'lık bir kısımda tomurcuk kopmasına, % 96'lık bir kısımda ise hayatta kalıma sebep olmuştur. Protokolde 3-indol-butirik asit (IBA) ve kinetinin 1.0 mg/l kombinasyonunu içeren MS ortamı kullanılmıştır. Bu işlemlerde en iyi sürgün sayısı (3,6 eksplant) ve sürgün uzunluğu (2,2 cm) elde edilmiştir. İn vitro sürgünler 0.2 mg/l IBA ve 0.2 mg/l a-naftalen asetik asit (NAA) içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Çalışma sonunda araştırıcı optimum köklendirme (% 60), ortalama 2-3 kök/sürgün, yaklaşık 2,4 cm destekli 1,5 g/l aktif kömür içeren dört haftalık kültürde gözlemlemiştir.

Chalak ve ark. (2014), Yüzyıllardan beridir zeytin ağaçlarının çoğu Akdeniz'de bulunmaktadır ve de değerli bir miras olarak görülmektedir. Maalesef bu ağaçlar; gelişen süs bitkiciliği ve geleneksel zeytinliklerin yerini alan ticari amaçlı meyve bahçeleri nedeniyle yavaş yavaş yok olmaktadırlar. Tüm bu nedenlerden ötürü eski zeytin ağaçlarının korunması ve yenilenmesi önemli bir görevdir. Bu çalışmada, bu yüzyıllık zeytin ağaçlarının in vitro potansiyellerinin araştırılması ve bu ağaçların yenilenmesi amaçlanmıştır. MS ve OM ortamlarında, tek düğümlü kesimler kullanılarak, sukroz veya mannitol ve 4 mg/l zeatin eklenerek kültürler oluşturulduğunda hayatta kalım oranları sırasıyla %43 ve %62 olarak gerçekleşmiştir. Kurulan eksplantlar, eksplant başına ortalama 1.0 ile 1.5 atmayla yeni sürgünlerin rejenerasyonuna sebep olmuştur. Dört ardışık alt kültür, çoğalma oranı 1.5 ile 3.2 atma arasında değişecek şekilde aynı kültür ortamında yürütülmüştür. Köklenme aşaması, 2 mg/l NAA ile takviye edilmiş, katı, yarı kuvvetli MS ortamında % 62'lik oranla başarıyla sağlanmıştır. Bu sonuçlar hem doku kültürünün etkinliğini hem de tarihi zeytin ağaçlarının yenilenip geniş ölçekli yayılabilme potansiyellerini göstermiştir.

Belkoura (2018), "Fas Picholine" Fas için önemli bir zeytin çeşididir. Bu çalışmanın ana amacı, bu bitkinin klonal mikro çoğaltımını mümkün kılacak şekilde somatik embriyogenezinin ekspresyonunu sağlayacak bir protokol geliştirmektir. Fas'ta geçmişte bu bitki türüyle ilgili olarak, bu konuda; özellikle de Fas Picholine'in in vitro rejenerasyonuna yanıtlarıyla ilgili çok az sayıda çalışma yapılmıştır. In vitro eksplantlar, in vitroda yarım kuvvetten oluşan dört ortam üzerinde 6 hafta boyunca ekim yapılıp ve yetiştirilerek rejenere edilmiş yaprak ve yaprak saplarıyla başlatılmıştır. Bu süreçte çeşitli ortamlarla desteklenmiş zeytin ortamı; (OM / 2) bitki büyüme düzenleyicileri (PGR); 1); thidiazuron (TDZ) ve 3-indolbutirik asit (IBA); 2); TDZ ve a-naftalenasetik asit (NAA); 3); zeatin riboside (ZR) ve IBA; ve 4) ;ZR ve NAA kullanılmıştır. İndüklenen kalluslar, OM, 4 hafta boyunca IBA ile desteklen çoğalma ortamına transfer edilmiştir. Daha sonra kalluslar, zeytinin embriyogenez ortamı olan siklik embriyogenez kültür ortamına (ECO) 4 haftada bir ortamın yenilenmesi koşuluyla aktarılmışlardır. Bu çalışmada ilk defa Fas Picholine' in somatik embriyo oluşumlarını; sapı IBA ve ZR ile takviye edilmiş, ayrıca kültür ortamı NAA ile desteklenmiş durumda embriyogenez ekspresyon oranı %6,93, yaprak sapı %11,93 ve ara yaprak bıçağı %7,66 olmak üzere gözlemlenmiş. Aynı zamanda, TDZ ve NAA ile desteklenmiş indüksiyon ortamında adventif tomurcukların oluşumu gözlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 2017-2018 yıllarında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Kültürü laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.Materyal

Başlangıç materyali olarak, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümü serasında yetiştirilen Nizip Halhallı, Arbequina, Gemlik, Gulleki ve Hursuki çeşitlerine ait fidanların yeşil sürgünlerindeki boğumlar ve sürgün uçları kullanılmıştır. Vejetasyon döneminin başlamasıyla birlikte su stresini önlemek ve sağlıklı bir sürgün gelişimi sağlamak amacıyla fidanlara gerektiği zaman gerekli miktarda su verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki materyalinin (eksplant) yüzeysel sterilizasyonu

Yeşil sürgünlerin, yaprakları çıkarıldıktan sonra genç sürgün uçları ve boğum araları parçacıklar şeklinde kesilmiştir. Laboratuvarda saf su altında 30 dakika (dk.) tutulan eksplantlara streril kabinde cıva klorür eklenip 15 dakika (dk.) bekletilmiştir. Cıva klorür içindeki eksplantlar alındıktan sonra steril distile saf su ile 3-5 kez durulanmıştır. %70'lik etil alkolde 3 dakika (dk.) bekleyen örneklere bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sodyum hipoklorit (NaOCl) konsantrasyonu olan %10'luk ticari çamaşır suyu ve bir-iki damla Tween 20 içeren karışımda 10 dakika yüzey temizliğine tabii tutulduktan sonra 5'er dk. 3-5 kez steril distile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Daha sonra sterilizasyonu tamamlanmış eksplantlar başlangıç kültür ortamı içeren küçük cam kavanozlara transfer edilmiştir.

3.2.2. Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan test tüpler, petriler, pensler, bistüriler ve fayanslar alüminyum folyoya sarılarak 121°C'de, 1 atm. basınç altında, 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışma süresince kullanılan pens ve bistüriler %96'lık etil alkole batırıldıktan sonra mavi aleve tutularak sık sık sterilize edilmiştir. Çalışmaya başlamadan en az 15 dk. önce steril kabin çalıştırıldıktan sonra içi %70'lik etil alkol ile temizlenmiş buna ek olarak 15 dk. süre ile UV lambası açık tutulmak suretiyle kabinin sterilizasyonu tamamlandıktan sonra kabinde çalışmaya başlanılmıştır. Hazırlanan besin ortamları 121°C'de, 1 atm. basınç altında, 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Şekil 3.1. de sterilize edilmiş besin ortamı ve Şekil 3.2. de çalışma alanından görüntü verilmiştir.



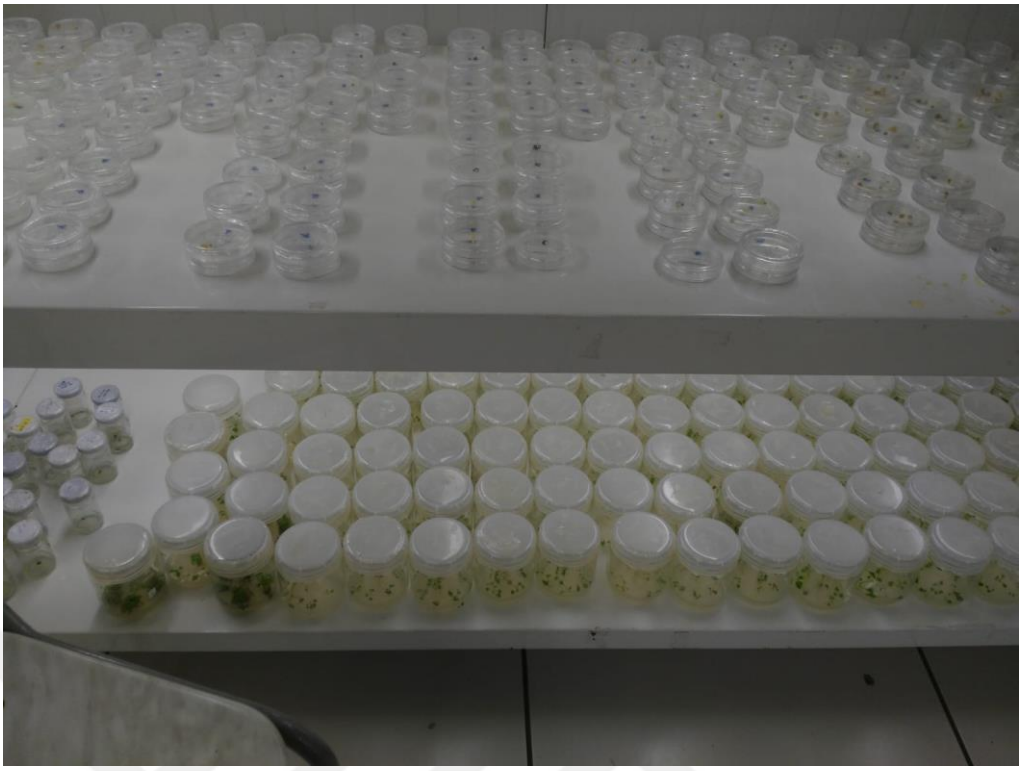
Şekil 3.1. Otoklavlanmış besin ortamı



Şekil 3.2. Steril kabin çalışma alanı

3.2.3. Kültür Şartları

Bu çalışmada kullanılan iklim kabininin ışık yoğunluğu 2500-3000 lüks'e ayarlanmış olup, 16 saat (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) fotoperiyot uygulanacak şekilde programlanmıştır. Ortam sıcaklığı 24±1°C'de tutulmuştur. İklim odası 2500-10000 lüks ışık şiddetine sahip olup, zaman ayarlayıcı ile 16 saat fotoperiyot uygulaması gerçekleştirilmiştir. İklim odasının sıcaklığı klima ile, nemi nemlendirici ile sağlanmıştır. Şekil 3.3. te iklim odasından bir görüntü verilmiştir.



Şekil 3.3. İklim odasından bir görüntü

3.2.4. Boğum ve Sürgün ucu eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması

Başlangıç kültür ortamı olarak kullanılan, 0.1 mg/l GA3,0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm,1 g/l AC(+), 4 gr/l OM (olive medium) ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış OM kültür ortamına ve 0.1 mg/l GA3,0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 4 gr/l MS ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış MS kültür ortamları hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan kültür ortamı 121°C de 15 dk. Sterilize edilmiştir. Yüzeysel sterilizasyonu tamamlanan Gulleki, Arbequina, Nizip Halhallı, Gemlik ve Hursuki çeşitlerine ait sterilize edilmiş boğum eksplantları ve sürgün ucu eksplantları homojen bir şekilde başlangıç kültür ortamında rejenerasyon denemelerinde kullanılabilecek şekil ve sayıda yaprak ve sürgün elde edilinceye kadar 4'er haftalık aralıklarla 3 alt kültüre alınmıştır. Her bir cam kavanoza 2-3 tane sürgün ucu ve boğum eksplantı yerleştirilmiştir. Kontaminasyonu önlemek amacıyla cam kavanoz kapakları streçle sarılmıştır. Her bir alt kültür sonunda kültür

ortamındaki kardeşlenme sayıları, sağlıklı ve canlılığını kaybetmiş eksplant oranları sayısal olarak hesaplanmıştır.

Kardeş çoğaltımının sağlanması için, yeni elde edilen bitkicikler parçacıklar şeklinde ayrılarak kardeşlenme sayıları belirlenmiş ve taze kültür ortamı üzerine transfer edilmiştir.

3.2.5. Mikro sürgünlerin yaprak sayısı, bitki boyu ve çoğalma katsayısı

Gulleki, Arbequina, Nizip Halhallı, Gemlik ve Hursuki çeşitlerine ait sürgün ucu ve boğum eksplantlarından elde edilen mikro sürgünlere ait yaprak sayıları, çoğalma katsayıları hesaplanmış ve oluşan mikro sürgünlere ait bitki boyları hassas cetvel (cm) ile ölçülmüştür.

3.2.6. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi

İn vitro'da elde edilen 0.5-3.0 cm boyundaki sürgünler küçük cam kavanozlar içerisine transfer edilerek kavanoz kapakları parafilm ile sarılmıştır. Sürgün köklendirme besin ortamı 4 mg/l IBA (indole-3-bütirik asit), 30 g/l sukroz, 7.5 g/l agar, 0.1 ml GA_3 ve 4.0 mg/l OM (olive medium) oluşmuştur. Köklendirme besin ortamının pH'ı, sterilizasyondan önce 5.7'ye 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

3.2.7. Dış koşullara alıştırma (aklimatizasyon)

İn vitro koşullarında köklendirme ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerin kökleri yıkanarak agardan temizlendikten sonra 3:1 oranında torf, perlit içeren plastik kaplara şaşırtılmıştır. Nemli bir dış ortam sağlamak amacıyla bitkiciklerin üzeri saydam poşetlerle kapatılmıştır. Dış koşullara alıştırma işleminin başlangıcından 1 hafta sonra kaplar her gün artan sürelerle (5-10 dk.) açılarak, bitkicikler dış koşullara alıştırılmaya çalışılmıştır. 1 hafta sonunda dış koşullara alışan bitkiciklerin canlılık oranları tespit edilerek, 3:1 oranında torf, perlit karışımından oluşan ortam içeren

10x10 cm ebadındaki viyollere aktarılmıştır. Alıştırma süresince bitkiciklere haftada bir kez sulama suyu verilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel değerlendirme

'Bazı zeytin çeşitlerinin in vitro mikro çoğaltımı' çalışmasında araştırma sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla tüm analizler Windows yazılımı için bilgisayar paket programı SPSS 24.0 ile yapılmıştır (SPSS Inc., NY, USA). Veriler Levene testi ve Shapiro Wilk testlerine göre sırasıyla varyasların eşitliği ve normallik varsayımları için istatistiksel olarak analiz edilmiştir ($P>0.05$). Daha sonra, veriler (çeşitler) GLM ve gruplar arasında herhangi bir farkın olup olmadığını araştırmak için çoklu karşılaştrma testi Tukey HSD kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler ortalama ile standart hata olarak sunulmuş olup önemlilik tüm testler için $P<0.05$ seviyesinde hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bitki Materyalinin Yüzeysel Sterilizasyonu

İn vitro çalışmalarda bitki materyallerinin etkili bir şekilde sterilizasyonu başarıyı etkileyen faktörlerin başında gelir. Bu nedenle, çalışmada ilk ve en önemli aşama kullanılacak olan bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon metodunun belirlenmesidir. Sterilizasyon yöntemleri kullanılan bitkilerin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda en yaygın kullanılan dezenfektanlar; etanol, kalsiyum, sodyum hipoklorit, gümüş nitrat, hidrojen peroksit ve civa klorürdür (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon yöntemi önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu amacıyla yeşil sürgünlerin, yaprakları çıkarıldıktan sonra genç sürgün uçları ve boğum araları parçacıklar şeklinde kesilmiştir. Laboratuvarda saf su altında 30 dakika (dk.) tutulan eksplantlara streril kabinde cıva klorür eklenip 15 dakika (dk.) bekletilmiştir. Cıva klorür içindeki eksplantlar alındıktan sonra steril distile saf su ile 3-5 kez durulanmıştır. %70'lik etil alkolde 3 dakika (dk.) bekleyen örneklere bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sodyum hipoklorit (NaOCl) konsantrasyonu olan %10'luk ticari çamaşır suyu ve bir-iki damla Tween 20 içeren karışımda 10 dakika yüzey temizliğine tabii tutulduktan sonra 5'er dk. 3-5 kez steril distile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra, enfekte olan, sağlıklı ve canlılığını kaybetmiş eksplant oranı (%) belirlenmiştir. Dört haftalık bir gelişme periyodunun sonunda, yüzeysel sterilizasyonu yapılan eksplantlar kültür ortamında normal gelişimlerine devam ederken, yüzeysel sterilizasyonu cıva klorür yapılarak kültüre alınan Nizip halhallı ve Hursuki çeşidine ait eksplantların kültür ortamlarında pembe bakteriler gözlemlenmiştir.

Deneme sonunda cıva klorür kulanımının eksplant yüzeysel sterilizasyonu üzerine etkinlikleri arasında fark görülmüş. Araştırmanın devamında Nizip halhallı

ve Hursuki çeşitlerine ait bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonunda cıva klorür kullanılmamıştır. Gulleki, Arbequina ve Gemlik çeşitlerine ait eksplantlarda herhangi bir kontaminasyon gözlemlenmemiştir. Bu çeşitlere ait bitkisel sterilizasyon yapılırken cıva klorür kullanılmıştır. Şekil 4.1. de strelizasyonun bir aşaması verilmiştir.



Şekil 4.1. Eksplantların saf suyla yıkanması

Eksplantın türü (boğum, boğum arası, tohum, sürgün ucu vb.) sterilizasyon yöntemini doğrudan etkilemektedir. Bundan dolayı, yapılan birçok araştırmada çok farklı uygulamalar yapılmıştır. Genel olarak in vitro çalışmalarının başlangıcındaki eksplantların sterilizasyonu, eksplantların yüzey direncini kırmak için kullanılan bir iki damla Tween-20 içeren %0.5-15'lik NaOCl, CaOCl veya HgCl solüsyonunda 6-20 dk. süre ile çalkalandıktan sonra 5'er dk. 3 kez steril saf su ile çalkalanarak tamamlanmıştır (Ainsley ve ark., 2001a; Channuntapipat ve ark., 2003). Şekil 4.2. de eksplant sterilizasyonu gösterilmiştir.

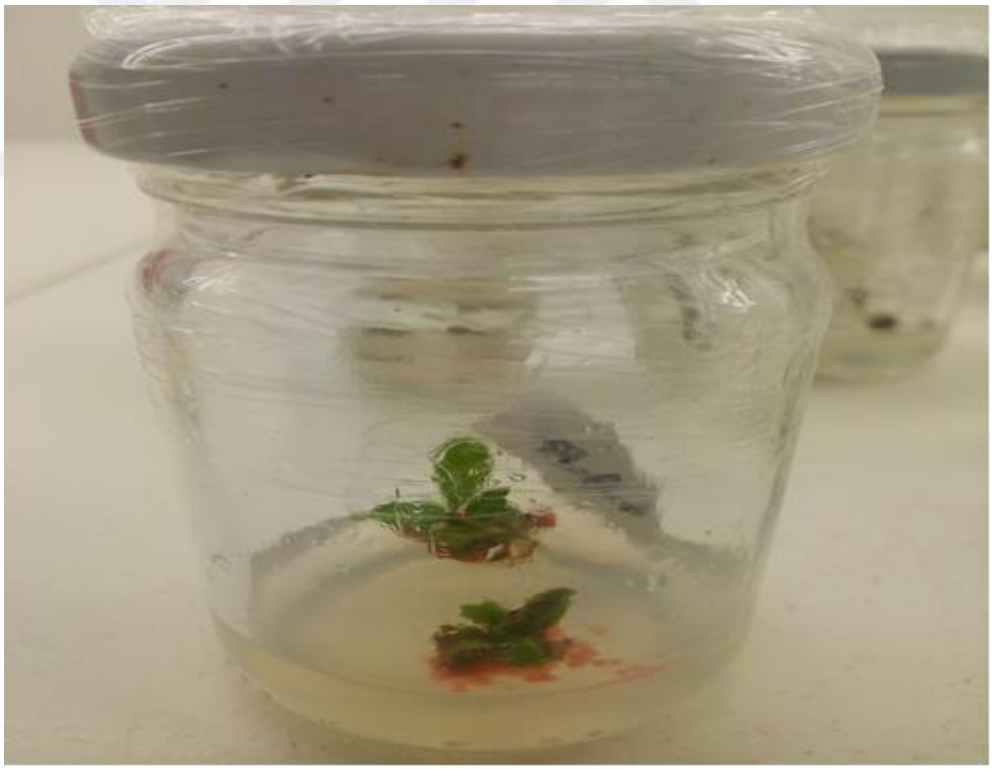


Şekil 4.2. Eksplantların tween 20 ile yıkanması

Buna karşılık sterilizasyonu birkaç aşamada gerçekleştiren araştırıcılar vardır. Bazı araştırıcılar (Gürel ve Gülşen, 1998; Ainsley ve ark., 2000; Ainsley ve ark., 2001b; Pruski ve ark., 2005) eksplant yüzeysel sterilizasyonuna geçmeden önce eksplant kaynaklarını musluk suyunun altında farklı sürelerde (5 dk.-2 saat) tutarak kaba temizliğini yapmıştır. Muna ve ark. (1999) eksplant kaynaklarını sadece musluk suyunun altında tutmayı kaba temizlik için yeterli görmeyerek bir iki damla Tween-20 ile 10-15 dakika yıkadıktan sonra asıl yüzeysel sterilizasyonuna geçmişlerdir. Jain ve Babbar (2003)'da aynı şekilde kullanacakları sürgünleri önce %10 (v/v) Teepol ile yıkayıp 30 dk. musluk suyu altında tuttuktan sonra asıl yüzeysel sterilizasyonuna başlamışlardır. Espinosa ve ark. (2006); Jain ve Babbar (2000), eksplantları kısa bir süre (30 sn.-5 dak.) etanolde (%50-70) beklettikten sonra ticari çamaşır suyu kullanılarak bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonunu tamamlamışlardır.

Bu çalışmada, kullanılan bitki çeşitleri ve eksplant türleri farklılık gösterdiği için her bir çeşit için farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Dolayısıyla yukarıda verilen araştırmalarda kullanılan farklı sterilizasyon yöntemlerinin yürütülmüş olan bu araştırmada kullanılan eksplantın yüzeysel sterilizasyonunda uygulanmasına gerek olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan eksplantların yüzeysel sterilizasyonu için Nizip halhallı ve hursuki çeşitlerinde cıva klorür kullanılması durumunda başlatılan kültürlerde kontaminasyon meydana gelmiş ve bitkiler canlılıklarını kaybetmişlerdir. Gulleki, Arbequina ve Gemlik çeşitlerinde cıva klorür ile başlatılan kültürlerde herhangi bir kontaminasyon meydana gelmemiş olup, in vitro sürgünlerde herhangi bir morfolojik değişim görülmeden, gelişimlerine devam etmişlerdir. Şekil 4.3. te Nizip Halhallı çeşidi cıva kullanımı durumunda oluşan bakteriler gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Nizip halhallı çeşidi cıva klorür kullanımı durumunda oluşan bakteriler

4.2.Boğum ve sürgün ucu eksplantlarından sürgün gelişimi ve kardeşlenme

Başlangıç kültür ortamı olarak kullanılan, 0.1 mg/l GA3, 0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 1 g/l AC(+), 4 g/l OM (olive medium) ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış OM kültür ortamı ve 0.1 mg/l GA3, 0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 4 g/l MS ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış MS kültür ortamlarına boğum ve sürgün ucu eksplantları transfer edildikten sonra bu eksplantlardan kardeşlenme ve sürgün gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra her bir çeşide ait alt kültüre alınabilecek eksplant sayıları çizelge 4.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Alt kültüre alınan bitki sayısı

Bitki çeşidi	Giriş	1a	2a	3a
Gulleki	37	53	58	79
Nizip halhallı	23	42	48	53
Hursuki	35	28	16	5
Gemlik	106	19	10	8
Arbequina	54	8	18	5

0.1 mg/l GA3 ,0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 4 g/l MS ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış MS kültür ortamına alınan Gulleki ve Nizip halhallı çeşitlerine ait boğum ve sürgün ucu eksplantları 4 haftalık periyot sonunda gözlemlenmiştir ve bu çeşitlere ait eksplantlarda sürgün gelişimi olmamıştır. Ayrıca MS kültür ortamına transfer edilen boğum ve sürgün ucu eksplantları canlılığını yitirmiş ve kardeşlenme sağlanamamıştır. Eksplantların tamamında gelişme gözlemlenmemiştir.

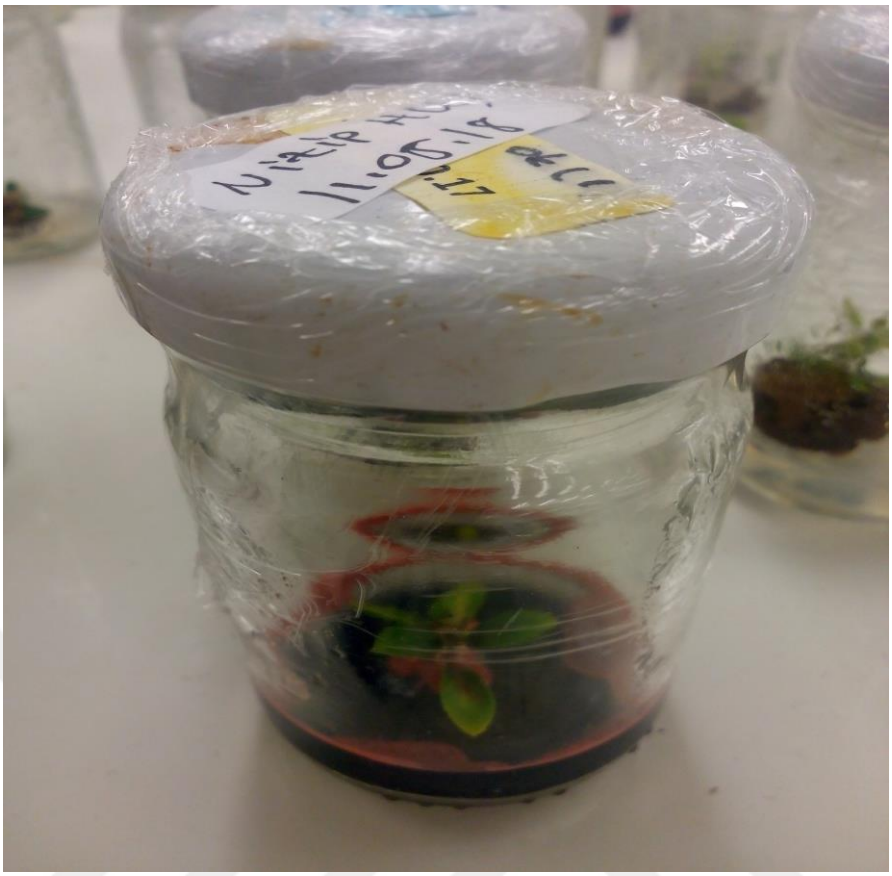
Daha sonra 0.1 mg/l GA3,0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 4 g/l OM ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış OM kültür ortamına alınan Gulleki ve Nizip halhallı çeşitlerine ait boğum

ve sürgün ucu eksplantları 4 haftalık periyot sonunda gözlemlenmiştir. Şekil 4.4. de Gulleki çeşidine ait kardeşlenmiş eksplantlar verilmiştir.

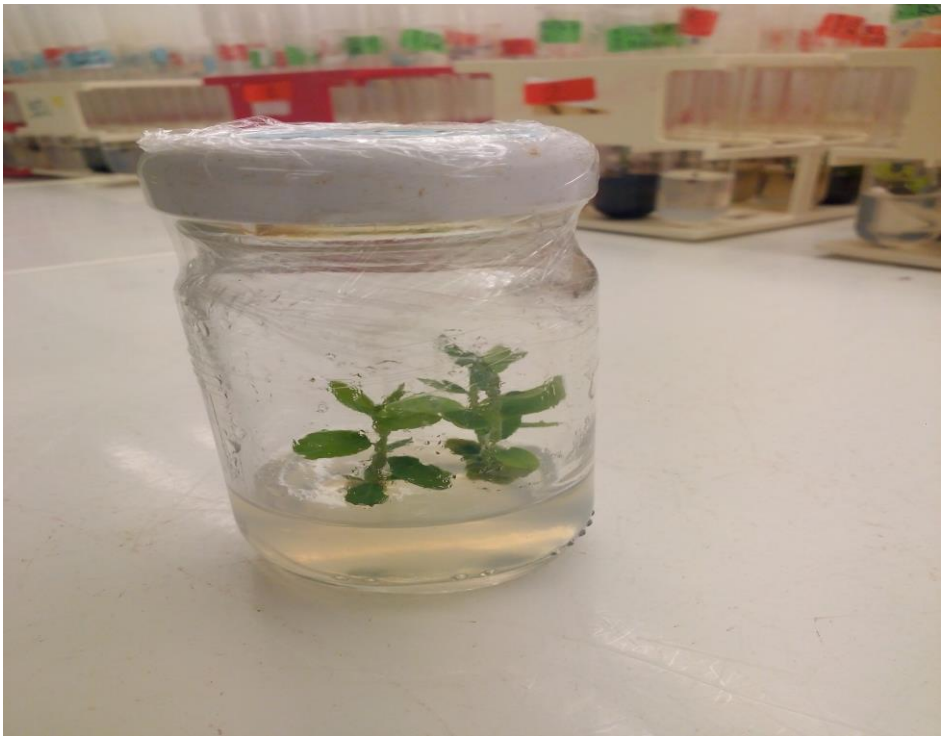


Şekil 4.4. Gulleki çeşidine ait kardeşlenmiş eksplantlar

Nizip halhallı çeşidine ait bitki yüzeysel sterilizasyonunda ilk aşamada cıva klorür kullanıldığı için kardeşlenme ve sürgün gelişimi istenen düzeyde olmamıştır. Daha sonra cıva klorür kullanılmadan yapılan sterilizasyona devam edilmiş ve OM ortamında tekrar giriş yapılarak alt kültüre alınmıştır. Bu çeşitlere ait kültür ortamında AC (aktif karbon) kullanılmamıştır. Şekil 4.5. ve şekil 4.6. da AC kullanımı ve kullanılmaması arasındaki fark gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Nizip Halhallı çeşidinde AC ortamında cıva kullanımı durumunda oluşan görüntü



Şekil 4.6.Nizip halhallı çeşidi sağlıklı eksplant görünümü

Hursuki, Arbequina ve Gemlik çeşitleri ise diğer çeşitlere ait eksplantlarda sürgün gelişimi ve kardeşlenme olmadığı için 0.1 mg/l GA3 ,0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm, 4 g/l MS ve 7.5 g/l agar içeren MS kültür ortamına alınmamıştır ve MS ortamı bu aşamadan sonra kullanılmamıştır.

Aynı zamanda yapılan ön çalışmalar Hursuki ve Arbequina çeşidi için 0.1 mg/l GA3, 0.5 mg/l IBA 30 g/l sukroz, 1 mg/l zeatin, 1mg/l ppm,1 g/l AC(+), 4 gr/l OM (olive medium) ve 7.5 g/l agar içeren, pH'sı 5.7'ya 1 N NaOH veya HCl ile ayarlanmış OM kültür ortamı kullanılmış Nizip halhallı ve Gulleki çeşidinden farklı olarak bu iki çeşit için AC(+) başlangıç kültür ortamına ilave edilmiştir. Bunun sebebi ise bu çeşitlerin fenolik bileşik salgılamasıdır. Doku kültürü çalışmalarında aktif karbon kullanımı fenolik bileşiklerin salınımını engellemektedir. Hursuki çeşidinde aktif karbon kullanılmadan önce yapılan kültür ortamında çok sayıda pembe bakteriler gözlemlenmiş ve bitkilerde kardeşlenme sağlanamamıştır. Şekil 4.7. ve Şekil 4.8. de Hursuki çeşidinde aktif karbon kullanımı ve kullanılmaması durumunda eksplantların gelişimi gösterilmişitir.

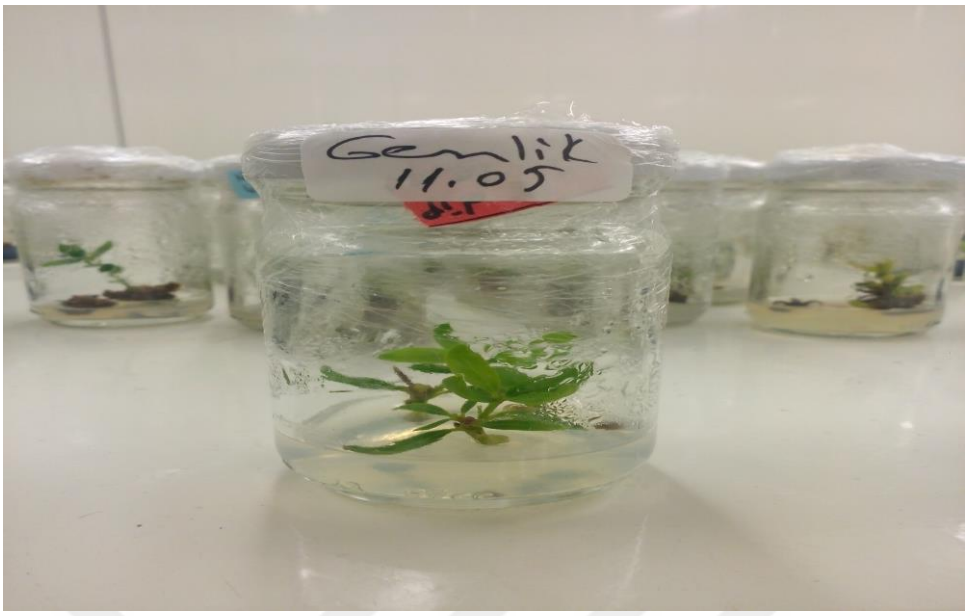


Şekil 4.7. Hursuki çeşidi aktif karbon kullanılmaması durumunda eksplantların gelişimi

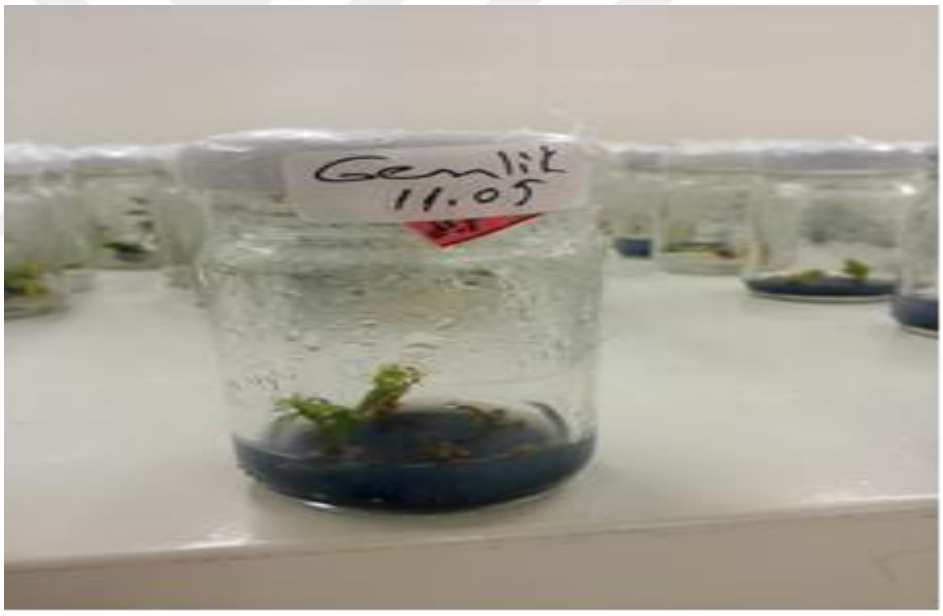


Şekil 4.8. Hursuki çeşidi aktif karbon kullanılması durumunda eksplantların gelişimi

Aynı şekilde yapılan ön denemeler Gemlik çeşidinin başlangıç kültür ortamına eklenen aktif karbonda sürgün gelişimi sağlamadığı ve kardeşlenmenin yeterli düzeyde olmadığını göstermiştir. Gemlik çeşidi ise aktif karbon kullanılmadan yapılan başlangıç kültür ortamına alınmıştır ve devam eden alt kültürlerde de aynı şekilde aktif karbon kullanılmamıştır. Şekil 4.9. ve Şekil 4.10. da Gemlik çeşidinde aktif karbon kullanımı ve kullanılmaması arasındaki fark gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Gemlik çeşidinin aktif karbonsuz ortamdaki eksplantların görünümü



Şekil 4.10. Gemlik çeşidinin aktif karbonlu ortamdaki görünümü

Yapılan alt kültürler oranında en iyi kardeşlenmeyi ve sürgün gelişimini gösteren çeşit %82.6 ile Nizip halhallı olmuştur. Aynı şekilde Gulleki çeşidi % 56.7 oranında kardeşlenme ve sürgün gelişimi sağlanmıştır. Arbequina, Hursuki ve gemlik çeşitlerinde istenen düzeyde kardeşlenme ve sürgün gelişimi sağlanamamıştır. Bu çeşitlere ait alt kültür verilerinin istatiksel sonuçları çizelge 4.2. de yer almaktadır.

Çizelge 4.2.Bitkiler için tek yönlü ANOVA tablosu

V. Kaynağı	SD	KT	KO	F	P	
Bitkiler	4	6926,67	1731,67	19,97	0,000	***
Hata	10	867,33	86,73			
Genel	14	7794,00				

Yapılan analizler sonucunda verime etkisi açısından bitkiler arasında istatistiki olarak %5 hata seviyesinde anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Sonuçlar çizelge 4.3. te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Bitkilerin Tukey HSD çoklu karşılaştırma sonuçları

Bitkiler	Ort±St. Hata
Gulleki	63.33±5.37a
Nizip Halhallı	47.66±5.37a
Hursuki	16.33±5.37b
Gemlik	12.33±5.37b
Arbequına	10.33±5.37b

Yapılan Tukey çoklu karşılaştrma sonuçlarına göre verime etkisi bakımından Gulleki (63.33±5.37a) ve Nizip halhalı (47.66±5.37a) bitkileri arasında fark olmayıp en yüksek çoğalmayı, Hursuki, Gemlik ve Arbequina bitkileri de aynı grupta olup en düşük verimi verdikleri görülmektedir ($p<0.05$).

4.2. Mikro sürgünlerin yaprak sayısı, bitki boyu ve çoğalma katsayısı

Mikro sürgünler kök ortamına alınmadan önce bu sürgünlere ait yaprak sayısı, bitki boyu ve çoğalma katsayısı gibi değerler hesaplanmıştır. Bu değerler aşağıdaki çizelge 4.4. te mevcuttur.

Çizelge 4.4. Mikro bitkilere ait bazı veriler

Bitki çeşidi	En düşük yaprak sayısı	En yüksek yaprak sayısı	En düşük bitki boyu(cm)	En yüksek bitki boyu(cm)	En düşük çoğalma katsayısı	En yüksek çoğalma katsayısı
Gulleki	4.0	20.0	1.5	5.5	0	2
Nizip halhallı	4.0	23.0	1.0	4.0	0	2
Gemlik	1.0	9.0	0.5	2.5	0	0
Hursuki	1.0	1.0	0.5	0.5	0	0
Arbequina	0	1.0	0.5	0.5	0	0

Bu çeşitlere ait en yüksek yaprak sayısı 23.0 ile Nizip halhallı çeşidinde gözlemlenmiş ve Arbequina çeşidinde ise hiç yaprak oluşmamıştır.

En düşük bitki boyu 0.5 cm ile Gemlik, Hursuki ve Arbequina çeşitlerinde gözlemlenmiş; en yüksek bitki boyu ise 5.5 cm ile Gulleki çeşidinde kayıt altına alınmıştır. Şekil 4.11. de mikro bitkiciklerin ölçümü gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Gulleki çeşidine ait mikro bitkiciklerin hassas cetvel ile ölçümü

En yüksek çoğalma katsayısı Gulleki ve Nizip halhallı çeşidinde görülmüş olup diğer çeşitlerde çoğalma oluşmamıştır.

4.3. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi

Araştırmanın bu aşamasında in vitro sürgünlerin köklendirilmesinde IBA'nın tek düzeyi kullanılmış olup çeşitler arasındaki köklenme oranlarına % olarak bakılmıştır. Çeşitlerin bu ortamda köklenme durumları araştırılmıştır. Kök ortamı 4 mg/l IBA (indole-3-bütirik asit), 30 g/l sukroz, 7.5 g/l agar, 0.1 ml GA_3 ve 4 g/l OM (olive medium) oluşmuştur. Köklendirme besin ortamının pH'ı, sterilizasyondan önce 5.7'ye 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

Bu çeşitler arasında en iyi köklenmeyi gösteren Gulleki çeşidi olup % 89.74 oranında köklenme sağlanmıştır. Aynı şekilde Nizip halhallı çeşidinde ise % 89.06 oranında köklenme sağlanmıştır. Bu çeşitlere ait köklenmeler şekil 4.12. ve şekil 4.13. de gösterilmiştir.

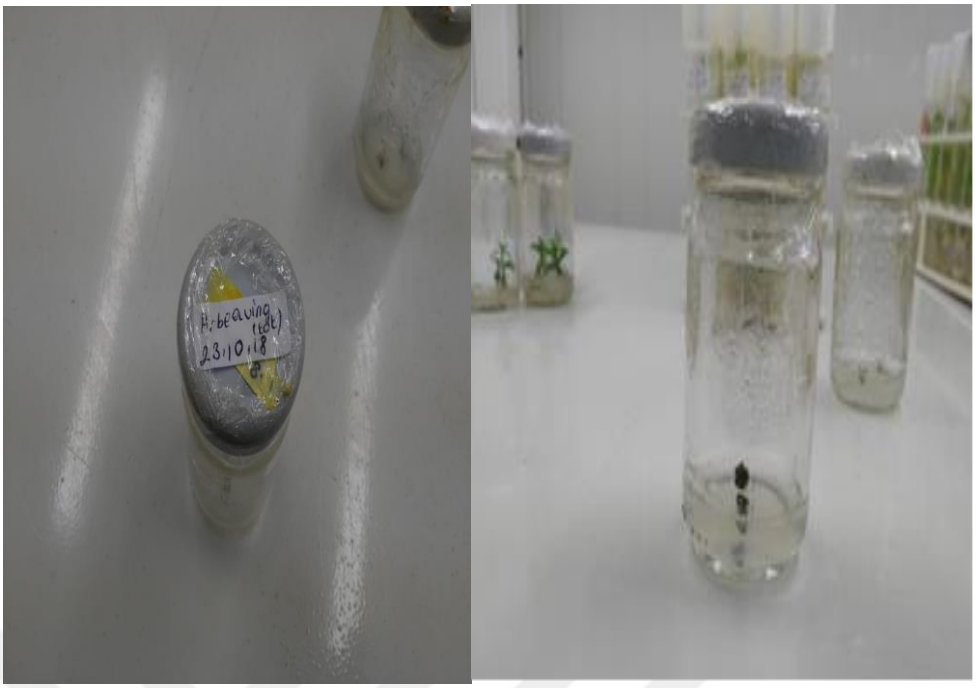


Şekil 4.12. Kök ortamına alınan Gulleki çeşidi



Şekil 4.13. Gulleki çeşidine ait kökler

Hursuki, Gemlik ve Arbequina bitkilerinde yeteri kadar kardeşlenme sağlanamamış fakat elde edilen mikro sürgünler kök ortamına transfer edilmiştir. Bu çeşitlerde köklenme oluşmamıştır. Şekil 4.14. te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Arbequina çeşidinde ait köklenmemiş eksplant

4.4. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması

İn vitro koşullarında köklendirme ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerin kökleri yıkanarak agardan temizlendikten sonra 3:1 oranında torf, perlit içeren plastik kaplara şaşırtılmıştır. Nemli bir dış ortam sağlamak amacıyla saydam poşetlerle kapatılmıştır. Dış koşullara alıştırma işleminin başlangıcından 1 hafta sonra kaplar her gün artan sürelerle (5-10 dk.) açılarak, bitkicikler dış koşullara alıştırılmaya çalışılmıştır. 1 hafta sonunda dış koşullara alışan bitkiciklerin canlılık oranları tespit edilerek, 3:1 oranında torf, perlit karışımından oluşan ortam içeren 10x10 cm ebadındaki viyollere aktarılmıştır. Şekil 4.15. te gösterilmiştir. Alıştırma süresince bitkiciklere haftada bir kez sulama suyu verilmiştir.



Şekil 4.15. Viyollere aktarılmış mikro bitkiler

4 hafta sonunda viyollere aktarılan bitkiciklerin % 50'si canlılığını yitirmiştir. Geriye kalan bitkilerde ise kararmalar başlamıştır. Torf-perlit ortamına aktarılan bitkiciklerin canlılık oranının düşük olmasının sebeplerinden birisi, köklerin dikim sırasında zararlanmış olabileceğindendir. Bundan dolayıdır ki dikim sırasında köklerin zararlanmasını önlemek için bitkiciklerin kökleri ortalama olarak 15 mm'yi geçmeden alıştırma ortamına aktarılmalıdır. Şekil 4.15. te dış koşullara adapte edilmeye çalışılan mikro bitkicikler verilmiştir.



Şekil 4.16. Dış koşullara alıştırılan mikro bitkicikler

Yine bu araştırmaya paralel olarak Muna ve ark. (1999)'nın Maxma-14 kiraz çeşidinde yürüttükleri çalışmada bitkiciklerin köklendikten kısa bir süre sonra saksılara aktarıldığında, dış koşullara daha kolay alıştıkları vurgulanmıştır.

İn vitro çalışmalarda elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması aşamasında en önemli nokta su kaybını önlemek ve besin maddesini sağlamaktır. Torf Perlit ortamına aktarılan bitkiciklerin canlılık oranlarındaki düşüklüğün başlıca sebebi olarak besin maddesi yetersizliğinin olduğu varsayılmaktadır. İn vitro bitkicikler dış koşullara alıştırılırken nem oranı yüksek olan iklim odalarında tutulup aşamalı olarak nem oranının azaltılması da gerekmektedir.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemiz genelinde ve özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen Gulleki, Hursuki, Nizip halhallı, Gemlik ve Arbequina zeytin çeşitlerinin sürgün uçları ve boğum araları kullanılarak çoğalma (OM/zeatin) ve köklenme (OM/IBA) durumları çeşit bazında araştırılmıştır. Birbirinden farklı bu çeşitlerin aynı ortam şartları altında gösterdikleri etkiler araştırılmış ve bu çeşitlere özgü protokol oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla araştırma kapsamında aşağıdaki denemeler yapılmıştır.

1. Bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonu,
2. Boğum eksplantları ve sürgün ucu eksplantlarının başlangıç ortamında kültüre alınması ve sürgün çoğaltımı,
3. Mikro sürgünlerin yaprak sayısı, bitki boyu ve çoğalma katsayısı
4. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi,
5. Köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması.

Kültür başlangıç materyali olarak Gulleki, Hursuki, Nizip halhallı, Gemlik ve Arbequina çeşitlerinin yeşil sürgün uçları ve boğum eksplantları kullanılmıştır. Boğum eksplantları sürgün ucu yüzeysel sterilizasyonu %10'luk NaOCl ile yapıldıktan sonra eksplantlar, 1 mg/l zeatin içeren OM besin ortamında 4 haftalık periyotlarla alt kültüre alınarak, araştırma için gerekli olan mikro bitkicikler elde edilmiştir. Elde edilen mikro bitkilerin boyu, yaprak ve çoğalma katsayıları tespit edilerek 4 mg/l IBA içeren OM kültür ortamına transfer edilmiştir.

Gulleki, Hursuki, Nizip halhallı, Gemlik ve Arbequina çeşitleri 1 mg/l zeatin içeren OM ortamında alt kültüre alındığında bu ortama %82.6'lik bir oranla kardeşlenme ve sürgün oluşumunu en iyi sağlayan Nizip halhallı çeşidi olmuştur.

Nizip halhallı çeşidinden sonra en iyi sonuç % 56.7 ile Gulleki çeşidinde gerçekleşmiştir. Nizip halhallı çeşidinin yapılan ön denemeler sonucu sterilizasyon aşamasında cıva klorür kullanıldığında kontaminasyon oluştuğu ve sürgünlerde kararmalar olduğu gözlemlenmiştir.

Hursuki çeşidinin alt kültüre alınan sürgün uçları ve boğum araları yoğun bir şekilde fenolik bileşik salgılamıştır. Bu çeşit için yapılan ön denemeler sonucu 1 mg/ml zeatin içeren OM ortamına aktif karbon ilave edilmiştir.

Gemlik çeşidi ise 1 mg/l zeatin içeren OM kültür ortamına pek adapte olamamıştır. Yine aynı şekilde yapılan ön çalışmalar sonucu Gemlik çeşidi için aktif karbon kullanılmamıştır. Aktif karbon kullanılmamasının sebebi bitkinin aktif karbon kullanılan ortamda daha iyi gelişme göstermiş olmasıdır.

Arbequina çeşidinde yapılan ön deneyler sonucu yüksek düzeyde fenolik bileşik salgıladığı için aktif karbon içeren 1 mg/l zeatin içeren OM ortamına alınmıştır. Buna rağmen bu çeşitte çoğalma çok düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Çoğalan bitki sayıları mikro çoğaltım için yeterli seviyeye ulaşmamıştır.

Yapılan istatistik analizi sonuçlarına göre çoğalma etkisi bakımından Gulleki (63.33±5.37a) ve Nizip halhalı (47.66±5.37a) bitkileri arasında fark olmayıp en yüksek çoğalma oluştuğu ve Hursuki, Gemlik ve Arbequina bitkileri de aynı grupta olup en düşük çoğalmayı verdikleri görülmektedir.

Köklenme ortamı için 4 mg/l IBA içeren OM kullanılmıştır. En iyi köklenme Gulleki çeşidinde % 89.74 ile köklenme olmuştur. Gulleki bitkisinden sonra Nizip halhallı çeşidinde % 89.06 oranında köklenme sağlanmıştır.

Hursuki çeşidinde çoğalma yeterli düzeyde olmadığı için kök ortamına alınan mikro bitkiciklerin sayısı da çok az olmuştur. Kök ortamına alınan sürgünlerde kök oluşmamıştır. Gemlik ve Arbequina çeşitlerinde de aynı şekilde çok az bitki kök ortamına transfer edilmiş olup Gemlik ve Arbequina çeşidinde köklenme

oluşmamıştır. Köklü bitkicikler 3:1 oranında torf-perlit içeren ortama transfer edilerek dış koşullara alıştırıldığında bitkiciklerin canlılık oranları %50 olmuştur.

Bitki doku kültürü çalışmalarında başarı elde edebilmek için, eksplant seçimi, uygulanan sterilizasyon yöntemi ve besin ortamlarının seçimi çok önemlidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, her tür ve çeşidin doku kültürü tekniklerine gösterdiği tepkilerin farklı olduğu görülmüştür. Eksplantın yaşı, donör bitkinin fizyolojik durumu, eksplant kaynağı gibi faktörler mikro çoğaltımı etkilemektedir. Besin ortamının türü, bileşenleri, optimum kültür şartları her bir genotip için farklılık göstermektedir.

Günümüze kadar zeytine ait çeşitlerde birçok araştırma yapılmasına rağmen, bu çalışmada kullanılan çeşitlerin mikro çoğaltım denemeleri ve bu konuya yönelik araştırmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle çalışmada karşılaşılan en büyük zorluk bu çeşitlere ait daha önce belirlenmiş bir mikro çoğaltım protokolu olmayışından dolayı, araştırmada önceki çalışmalar baz alınarak en uygun protokol oluşturulmaya çalışılmış ve çeşitler aynı uygulamaya tabi tutuldu. Doku kültürü çalışmalarında her çeşidin aynı ortama aynı tepkiyi göstermediği sonucuna varılmıştır.

Dolayısıyla bu çeşitlerin bitki rejenerasyonu çalışmasının tamamlanabilmesi için çeşit bazında farklı ortamlar, ışık yoğunlukları, yaprak eksplantlarının alt veya üst yüzlerinin besin ortamına temas etmesi vb. faktörler denenebilir. Zeytin türüne ait doku kültürü çalışmalarında karşılaşılan en önemli problem olan apikal dominans, farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı, besi ortamı makro ve mikro elementlerinin optimizasyonu ve biyoreaktör sistemlerinin denenmesi gibi yöntemlerle çözülmeye çalışılmaktadır. Bu araştırmada kullanılan bazı çeşitlere (Arbequina, Hursuki) ait yapılan bazı araştırmalarda mikro çoğaltım elde edebilmek için yüksek konsantrasyonlarda zeatin kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan zeatin konsantrasyonu yayınlanmış bilimsel araştırmalarda kullanılan konsantrasyonlara göre düşük kaldığı için sürgün rejenerasyonu elde edilememiş olabilir.

Diğer yandan bu çalışmada Gulleki, Nizip halhallı çeşidi için in vitro koşullarda sürgün ucundan sürgün rejenerasyonu ve köklenme için etkin bir protokol oluşturulmuştur. Bu çeşitler üzerinde biyoteknolojik çalışmaların yürütülmesi için gerekli olan ilk aşama sonuçlandırılarak bu çeşitlerle ilgili olarak gelecekte yapılacak in vitro ve biyoteknolojik araştırmalar için yararlanılabilecek bir çalışma olabilecektir.

KAYNAKLAR

ACEBEDO, MM., LAVEE, S., LİNAN, J. and TRONCOSO, A., 1997. In vitro Germination of embryos for speeding up seedling development in olive Breeding programes. Scientia horticulture, 69: 207-215.

AINSLEY P. J., COLLINS G. G. and SEDGLEY, M., 2000. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explants of Almond (Prunus dulcisMill.), In vitro Cellular and Development Biology-Plant, 36(6): 470-474.

AINSLEY, P. J., HAMMERSCHLAG, F. A., BERTOZZI, T., COLLINS, G. G. and SEDGLEY, M., 2001a. Regeneration of Almond from Immature Seed Cotyledons. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 221-226.

AINSLEY, P. J., COLLINS, G. G. and SEDGLEY, M., 2001b. In Vitro Rooting of Almond (Prunus dulcisMill.). In vitro Cellular and Development Biology Plant, 37:778-785.

BABAOĞLU, M., GÜREL, E. ve ÖZCAN, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.

BALDONİ, L., TOSTİ, N., RİCCİOLİNİ, C., BELAJ, A., ARCİONİ, S., PANELLİ, G., GERMANA, MA., MULAS, M. and PORCEDDU, A., 2006. Genetic structure of Wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. Annals of Botany (Lond), 98:935–942.

BARTOLİNİ, G., PREVOST, G., MESSERİ, C., CARİGNANİ, G. and MENİNİ, UG., 1998, Olive germplasm. Cultivars and World-Wide collections. FAO, Rome, Italy.

BELKOURA, I., OULBIL, S. and LOUTFI, K., 2018. Somatic embryogenesis from somatic explants of a Moroccan olive (Olea europaea L.) cultivar, 'Moroccan Picholine' Acta Hortic, Proc. VIII Int. Olive Symposium Eds.:S

BESNARD, G., BRETON, C., BARADAT, P., KHADARİ, B. and BERVİLLE, A., 2001. Cultivar identification in olive based on RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126(6):668-675.

BOUSTANY, N., 2009. The Millenium Olives (Olea europea L.) in Lebanon: Rejuvenation, Micropropagation and Olive Oil Variation during Maturation And Conservation. Scuola di Dottorato in Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari. Università Degli Studi Di Sassari.

CHANNUNTAPIPAT, C., SEDGLEY, M. and COLLINS, G., 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan x Nemaguard. Scientia Horticulturae, 98:473-484.

CHAARİ-RKHİS, A. and TRIGUI, A., MAALEJ, M. and DRİRA, N., 2002. Preliminary Results of Somatic Embryogenesis from Young Zygotic Embryos Of Olive Tree. Proc. 4th IS on Olive Growing Eds. C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS 2002.

CANTİNİ, C., CİMATO, A. and SANİ, G., 1999, Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica, 109: 173-181.

CEREZO, S., MERCADO, JA. and PLİEGO-ALFARO, F., 2011. An efficient Regeneration system via somatik embryogenesis in olive. Plant cell tissue and Organ culture, 106: 337-344.

CHAARI, A., CHAABOUNI, C., MAALEJ M and DRİRA, N. 2002. Meski Olive Variety Propagated by Tissue Culture. Proc. 4th IS on Olive Growing Eds. C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS

CHALAK,L., ELKHAWAND, H and ELBITAR, A. 2014. In Vitro Regeneration of Centennial Olive Trees (Olea europaea L.). Proc. VIIth IS on Olive Growing Eds.: F. Vita Serman et al. Acta Hort. 1057, ISHS.

ÇETİN, Ö., 2012. "Zeytin (Olea europaeaL.) Genotiplerinin DNA Markörleri yardımı İle Karakterizasyonu ". Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. İzmir, syf, 85.

DENAXA, N.K., VEMMOS, S.N. and ROUSSOS, P.A., 2011. The Effect of IBA, NAA and Carbohydrates on Rooting Capacity of Leafy Cuttings in Three Olive Cultivars (Olea Europaea L.) Proc. XXVIIIth IHC–Olive Trends Symposium Eds.: J. Tous et al. Acta Hort. 924, ISHS.

ESPINOSA, A. C., PIJUT, P. M. and MICHLER, C. H., 2006. Adventitious Shoot Regeneration and Rooting of Prunus serotina in vitro Cultures, Hortscience, 41(1):193-201.

FABBRİ, A., BARTOLİNİ, G., LAMBARDİ, M. and KAİLİS, S., 2004. Olive Propagation Manuel. CSIRO Publ., Australia, pp.130.

FARAHANİ, F., PEYVANDİ, M., ATAİİ,S., HOSSEİNİ and MAZİNANİ, M., 2011. In Vitro micrografting: a technique to improve multiplication and rooting plantles. Proc. "2nd Int. Seminar OLIVE-BIOTEQ 2006", Vol I. Marsala-Mazara del Vallo, Italy, pp.307-309.

FİORİNO, P. and LEVA, A.R., 1986. Investigations on the micropropagation of the olive (Olea europaea L.). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. Olea, 17:101–104.

FLAHAULT, R., 1986, L' Olivier , Ann. Ecole Nat. Agric. t. II. Montpellier. GARCI'A FERRİZ, L., GHORBEL, R., YBARRA, M., MARİ, A., BELAJ, A. and TRUJİLLO, I., 2002. Micropropagation from adult olive trees. Acta Hort. 586: 879–882.

GREEN, P.S.,2002. A revision of OleaL. (Oleaceae). Kew Bull. 57: 91–140.

GREEN PS and WİCKENS GE., 1989. The Olea europaeacomplex. In: Kit Tan (ed) The Davis & Hedge Festschrift. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 287-299.

GÜREL, S. ve GÜLŞEN, Y., 1998. The Effects of Different Sucrose, Agar, and pH Levels on in vitro Shoot Production of Almond (Amygdalus communisL.). Tr. J. of Botany, 22:363-373.

JAIN, N. and BABBAR, S. B., 2000. Recurrent Production of Plants of Black Plum Syzygium cuminii(L.) Skeels, a Myrtaceous Fruit Tree, From In Vitro Cultured Seedling Explants. Plant Cell Reports, 19:519-524.

JAIN, N. and BABBAR, S. B., 2003. Regeneration of "Juvenile" Plants of Black Plum, Syzygium cuminii Skeels, From Nodal Exp of Mature Trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73:257-263.

LAMBARDİ, M., BENELLİ, C., ÖZDEN-TOKATLI, Y., ÖZÜDOĞRU, E.A. and GÜMÜŞEL, F., 2006. A Novel Approach to olive Micropropagation: the Temporary İmmersion system, Proc. "2nd Int. Seminar OLIVEBIOTEQ 2006", Vol I: Marsala del Vallo, Italy, pp: 319-326.

LEVA, A.R., PETRUCCELLİ, R., GORETTİ, R. and PANİCCUCİ, M., 1992. Ruolo di Alcuni Microelementi e Carboidrati Nella Proliferazione in vitrodi cv. di olivo (Olea europaeaL.). Atti Conv. "Olive oil quality" Firenze 333–334.

LEVA, A., MULEO, R. and PETRUCELLİ, R., 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotiledons. Journal of horticultural sciences, 70:417-421.

LUCCHESİNİ, M. and VITAGLIANO, C., 2002. In Vitro Micro-Environments to Improve Growth of Olive Plantlets During the Rooting Phase. Proc. 4th IS on Olive Growing Eds. C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS

MAALEJ, M. and DRİRA, N., CHAARİ-RKHİS, A., and TRIGUI, A., 2002. Preliminary Results of Somatic Embryogenesis from Young Zygotic Embryos Of Olive Tree. Proc. 4th IS on Olive Growing Eds. C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS 2002.

MANGAL, M., SHARMA, D., and KUMAR, S., 2013. In vitro regeneration in olive cv, Frontio' from nodal segments. Indian Journal of Exprimental Biology Vol. 52, September 2014, pp. 912-916.

MİTRAKOS, K., ALEXAKİ, A. and PAPADİMİTRİOU, P., 1992. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. Journal of plant physiology, 139:269-273.

MENDOZA-de GYVES, E., MİRA, F.R., RUİU, F., and RUGİNİ, E., 2008. Stimulation Of Node and Lateral shoot Formation in micropropagation of olive (Olea EuropaeaL.) by using Dikegulac. Plant Cell Tiss Organ Cult 92:233–238.

MENCUCCİNİ, M., 2003. Effect of Medium Darkening on in vitro Rooting Capability and Rooting Seasonality of Olive (Olea europaeaL.) cultivars. Sci. Hort., 97:129–139.

MORETTENİ, A., 1972. Olivi coltura. Rama Editoriale Delgi Agricoltori.

MUNA, A., AHMAD, A., MAHMOUD, K. and ABDUL-RAHMAN, K., 1999. In Vitro Propagation of Semi-dwarfing Cherry Rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59:203-208.

NAIJA, S., ELLOUMI, N., BELFELEH, Z., MSELEM, M., GHEZEL, R. and BOUZID, S., 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive Olea europaea (L.) 'Chetoui'. Acta Physiol Plant (2011) 33:319–324.

ORINOS, TH., 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (Olea europaea var. sylvestris (Miller) Lehr) mature zygotic embryos Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27:183-187.

OULBI, S., BELKOURA, I. and LOUTFI,K., 2018. Somatic embryogenesis from somatic Explants of a Moroccan olive (Olea europaea L.) cultivar, 'Moroccan Picholine'.Acta Hortic. Proc. VIII Int. Olive Symposium Eds.:S

ÖZDEN, A,N., 2007. "GF-677 Hibrit (Prunus amygdalusx P. persica) Anacının in vitro Rejenerasyonu ve Mikro Çoğaltımı". Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, syf 50.

ÖZDEN, Y., ÖZÜDOĞRU, E.A., KAYA, E., ve AKDEMİR, H., 2010. Zeytin (Olea Europaea) Bitkisinin Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri (TIS) ile in vitro Sürgün Çoğaltımının İyileştirilmesi. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1-1:1-6

ÖZTÜRK, F., 2006. Türkiye'de ve Dünya'da zeytincilik sektörünün genel görünümü. TAYEK, Ege tarımsal araştırma enstitüsü müdürlüğü, yayın no: 125: 45-62

PRUSKI, K., ASTATKIE, T. and NOWAK, J., 2005. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (Prunus fruticosa) and Nanking Cherry (Prunus tomentosa). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82:207-211.

RALLO, L., BARRANCO, D. and ESCOBAR, F., 1997. El cultivo del olivo. Ediciones mundi prensa. pp. 701.

REMESAL-RODRİGUEZ, J., 1996. Economía oleícola: En la antigüedad, p. 47–58. In: consejo oleicola internacional (Ed.), 'Enciclopedia mundial del olivo, plaza Janes Editores S.A., Barcelona, Spain.

REVİLLA M. A., PACHECO J., CASARES A. and RODRİGUEZ R., 1996. In VitroCell. Dev. Biol.-Plant 32:257-261.

RUGİNİ, E, 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive. Plant cell tissue and organ culture, 14:207-214.

RUGİNİ, E. and PANELLİ, G., 1993. Preliminary results on increasingfruit set in olive by chemical and mechanical treatments. Acta Horticulturae, 286:93-96.

RUGİNİ, E. and Baldoni, L., 2004. Olea europea Olive. In: Litz RE (ed) Biotechnology Of Fruit and Nut crops. Chap 15 CABI Publishing, Noworty Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK, pp 404–428.

RUGİNİ, E., and CARİCATO, G., 1995. Somatic Embriyogenesis and Plant Recovery From Mature Tissues of Olive Cultivars (Olea europaeaL.) "Canino" and "Moraiolo". Pl. Cell Rep., 14: 257-260.

RUGİNİ, E. and FEDELİ, E., 1990. Olive (Olea europeaL.) as an oilseed crop. In: Bajaj, Y.B.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 10. Legumes and Oil seed crops I. Springer, Heidelberg, pp. 593±641.

RUGİNİ, E. and GUTİERREZ-PESCE, P. 2006. Genetic improvement of Olive. Pomologia Croatica, 12:43–74.

SGHIR, S., CHATELET, P., OUAZZANİ, N., DOSBA, F. and BELKOURA, I., 2005. Micropropagation of eight moroccan and french olive cultivars. Hort science, 40(1):193-196.

SHİBLİ, RA., SHATNAWİ, M., ABU, E. and AL-JUBOORY, KH., 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' olive. Scientia horticulturae, 88:243-256.

QRUNFLEH, MM., RUSHDİ, Y., MUSMAR, T. and RUSHDİ, L., 1994. Root Formation in cuttings of 'Nabali' olives with uniconazole and Indolebutyric acid. Dirasat, 21:71-79.

TRABELSİ, EB., NAIJA, S., ELLOUMİ, N., BELFELEH, Z., MSELLEM, M., GHEZEL, R. and BOUZİD, S., 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive olea europea 'chetoui'. Acta physiologia plantarum, 33:319-324.

TRANCOSO A., LINAN J., CANTOS, M., ACEBEDO, M. M. and RAPOPORT H. F. 1999. J.Hort. Sci. Biotech., 74:584-587.

TSAO, C.W.V. and REED, B.M., 2002. Gelling Agents, silver Nitrate, and Sequestreneiron İnfluence Adventitious Shoot and Callus Formation from Rubus Leaves. In VitroCell Dev. Biol.-Plant, 38:29–32

TURRİLL, W.B., 1951. Wild and cultivated olives. Brit. Ass. Adv. Sci. Kew Bull., 3, 437.

VIDOY-MERCADO,I., VIRUEL, M.A., PLIEGO-ALFARO, F. and IMBRADO, I. 2012. The Influence of In Vitro Micrografting on Vegetative Propagation of

the Olive Cultivar ‘Arbequina’. Proc. VIth IS on Olive Growing Eds.: E.M. Sampaio and A.C. Pinheiro Acta Hort. 949, ISHS.

ZAMORA, R., ALAİZ, M. and HİDALGO, F. J., 2001. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (Olea europaea) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. J. Agric. Food Chem, 49 (9): 4267-4270.

ZOHARY, D. and SPİEGEL-ROY, P., 1975. Beginning of fruit growing in the old World. Science, 187:319-327.

ZOHARY, D. and HOPF, M., 1993, Domestication of plants in the old world. Oxford clarendon press, 137-143.

ZUCHERELLI, G. and ZUCHERELLI, S., 2002. In Vitro Propagation of Fifty Olive Cultivars. Proc. 4th IS on Olive Growing Eds. C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeliha ÇİFTÇİ

Uyruğu : T.C

Doğum Yeri ve Tarihi : ŞANLIURFA/18.02.1993

Telefon : (0) 5435606176

E-mail : zelihaciftci63@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl,	BitirmeYılı
Lise	: Kız Teknik ve Meslek Lisesi Şanlıurfa	2011
Üniversite	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir	2016
Yüksek Lisans	:Harran Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Haliliye/ Şanlıurfa	2019

UZMANLIK ALANI : **BAHÇE BİTKİLERİ**