T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİŞİ BUTTUM (*Pistacia khinjuk* Stocks) AĞAÇLARININ *İn Vitro* MİKROÇOĞALTIMI

Yusuf ERSALI

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Eylül - 2014

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Yusuf ERSALI tarafından yapılan "Dişi Buttum Ağaçlarının (*Pistacia khinjuk* Stocks) *in vitro* Mikroçoğaltımı" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Ahmet ONAY

Üye : Prof. Dr. Haluk AYDIN

Üye : Doç. Dr. Hakan YILDIRIM

Üye : Doç. Dr. Emine AYAZ TİLKAT

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 29/09/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışma değerli hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'in danışmanlığında yürütülmüştür. Hocama, bilimsel metodoloji, bilgi doğrultusunda gözlem yapma, bilginin sorun çözme becerisi konularında ufkumu genişletmesi ve beni araştırmaya sevk eden yaklaşımı nedeniyle teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında yardımlarını, esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve karşılaşılan sorunların çözümünde yol gösteren, deneylerde planlama ve zamanında yapılması gerekenleri önceden görüp verimliliğimi artıran sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a teşekkür ederim.

Batman Üniversitesi biyoloji araştırma laboratuarında araştırma imkanı sağlayan ve deneysel çalışmalarda tecrübelerini paylaşan aynı zamanda eş danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Engin TİLKAT'a teşekkür ederim

Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kordinatörlüğüne verdiği proje kapsamında yol gösterici olan ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a teşekkür ederim.

Yoğun laboratuar çalışmaları ve iş gücünden dolayı beni yalnız bırakmayan ve destekleyen sevgili eşim Cemile ERSALI'ya ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma, Batman Üniversitesi Araştırma Fonu Proje Koordinatörlüğü tarafından BTÜBAP-2011-FED-1 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……..		i
İÇİNDEKİLER…….....		ii
ÖZET…….....		vi
ABSTRACT…….....		vii
ÇİZELGE LİSTESİ…….....		ix
ŞEKİL LİSTESİ…….....		xi
KISALTMA VE SİMGELER……..		xiii
1.	**GİRİŞ**…….....	1
2.	**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**……..	8
2.1.	*P. khinjuk* Hakkında Genel Bilgiler…….....	8
2.1.1.	Orijini……	8
2.1.2.	Taksonomik Tarihi……	8
2.1.3.	*P. khinjuk*'un Sistematikteki Yeri…….	10
2.1.4.	Biyolojisi……...	11
2.1.4.1.	Ağaç özelliği…….	11
2.1.4.2.	Yaprak Özelliği…….	11
2.1.4.3.	Çiçek Özelliği……	13
2.1.4.4.	Meyve Özelliği…….	14
2.1.4.5.	Anaç Özelliği…….	17
2.1.4.6.	Geleneksel Çoğaltım Metotları…….	18
2.2.	Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Teknikleri……..	19
2.3.	*P. khinjuk* ve diğer *Pistacia* türleri ile ilgili yapılan *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları…….	21
2.4.	Somaklonal Varyasyon ……	25
3.	**MATERYAL ve METOT**……..	28
3.1.	Mikroçoğaltım İle İlgili Materyal ve Metot……..	28
3.1.1.	Bitkisel Materyal…….....	28

3.1.2.	Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri…….	28
3.2.	Metot…….	29
3.2.1.	Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması……...	29
3.2.1.1.	Besi Ortamının İçeriği……...	29
3.2.1.2.	Besi Ortamlarının Hazırlanması ve dezenfeksiyonu…….	30
3.2.1.3.	Bitki Büyüme Düzenleyici Stok Çözeltilerinin Hazırlanması……..	34
3.2.1.4.	Bitki Büyüme Düzenleyici Çözeltisi Hazırlama……...	35
3.2.2.	Dezenfeksiyon Teknikleri…….	36
3.2.2.1.	Isı ile Dezenfeksiyon…….	36
3.2.2.2.	Kullanılan Aseptik Yöntemler……..	36
3.2.2.3.	Dezenfeksiyon Korunumu…….	37
3.2.2.4.	Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Korunumu……	37
3.2.2.5.	Cam Malzemelerin dezenfeksiyonu……..	37
3.2.2.6.	Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Dezenfeksiyonu…….	37
3.2.3.	Kültür Şartları……	37
3.2.3.1.	Büyüme Odası Koşulları……...	38
3.3.	Genel değerlendirme…….	38
3.3.1.	Dezenfeksiyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları……	38
3.3.1.1.	Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Dezenfeksiyon Metodunun Gelişimi……..	39
3.3.1.2.	Olgun Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl Etkisi……...	39
3.3.1.3.	Eksplantların Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'de Optimum Bekletme Süresinin Tespiti……	39
3.3.2.	Kültür Başlatılması Çalışmaları……	40
3.3.2.1.	Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi……...	40
3.3.2.2.	Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin Etkisi……..	41
3.3.2.3.	Kültür Başlatılmasına BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…….	41
3.3.2.4.	En İyi Rejenerasyon Zamanının Tespiti……...	41
3.3.3.	Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları……...	41

3.3.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi ortamı Tipinin Etkisi…… 42

3.3.3.2. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortamnın Farklı Kuvvetlerinin Etkisi…… 42

3.3.3.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi……. 42

3.3.3.4. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…….. 42

3.3.3.5. Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin Oksin Kombinasyonunun Etkisi……... 43

3.3.3.6. Sürgün Proliferasyonuna Karbonhidrat Tipinin Etkisi…….. 43

3.3.3.7. Sürgün Proliferasyonuna Sukrozun Farklı Konsantrasyonlarını Etkisi……. 43

3.3.4. Sürgünleri Köklendirme Çalışmaları…… 43

3.3.4.1. Sürgünlerin Köklenmesine Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi……... 44

3.3.4.2. Sürgünlerin Köklenmesi NAA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi..... 44

3.3.4.3. Sürgünlerin Köklenmesi Üzerine Sürgün Uzunluğunun Etkisi..... 45

3.3.5. Aklimatizasyon Çalışmaları…….. 45

3.3.5.1. Aklimatizasyon Çalışmalarına Torfun Etkisi…… 45

3.4. İstatistiksel Analiz ve Verilerin Değerlendirilmesi……... 46

3.5. Somaklonal Varyasyon İle İlgili Materyal ve Metot……. 46

3.6. Bitkisel materyal……... 46

3.7. Metot……. 46

3.7.1. Genomik DNA İzolasyonu…… 46

3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu…… 49

3.7.3. Agaroz Jelde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Elektroforezi…… 50

3.7.4. Oluşan Bantların Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramlarının Oluşturulması…….. 50

4. BULGULAR…… 51

4.1. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Dezenfeksiyon Metodunun Gelişimi…….. 51

4.1.1. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'nin Etkisi…….. 51

4.1.2. Eksplantların Yüzey Dezenfeksiyonu İçin NaOCl'de Optimum Çalkalama Süresinin Tespiti…… 52

4.2. Kültür Başlatma Çalışmaları……. 54
4.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi……... 54
4.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin Etkisi…….. 55
4.2.3. Kültür Başlatılmasına BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi……... 57
4.2.4. Kültür Başlatılması İçin En Uygun Zamanın Seçilmesi……... 59
4.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları……... 61
4.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi……... 61
4.3.2. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Etkisi…... 63
4.3.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi……. 64
4.3.4. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…….. 66
4.3.5. Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin Oksin Kombinasyonunun Etkisi…….. 69
4.3.6. Sürgün Proliferasyonuna Karbonhidrat Tipinin Etkisi…….. 72
4.3.7. Sürgün Proliferasyonuna Sukrozun Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…….. 75
4.4. Sürgünleri Köklendirme Çalışmaları…… 78
4.4.1. Sürgünlerin Köklenmesine Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi……... 78
4.4.2. Sürgünlerin Köklenmesine NAA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi..... 81
4.4.3. Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi..... 83
4.5. Aklimatizasyon Çalışmaları…….. 84
4.5.1. Aklimatizasyon Çalışmalarına Torfun Etkisi…… 85
4.6. Somaklonal Varyasyon Çalışmaları…….. 87
5. TARTIŞMA ve SONUÇ……. 92
5.1. Materyalin Yüzey Dezenfeksiyonu……... 92
5.2. Kültür Başlatılması…… 95
5.3. Sürgün Proliferasyonu…..…….. 97
5.4. Köklendirme Çalışmaları…….….. 99
5.5. Aklimatizasyon ve Bahçe Koşullarına Aktarma …….. 102
5.6. Somaklonal Varyasyon Analizi……. 103
6. KAYNAKLAR……. 106
ÖZGEÇMİŞ……... 123

ÖZET

DİŞİ BUTTUM (*Pistacia khinjuk* Stocks) AĞAÇLARININ *in vitro* MİKROÇOĞALTIMI

DOKTORA TEZİ

Yusuf ERSALI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2014

Bu çalışmada, dişi buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) ağaçlarından alınan apikal ve lateral sürgün uçları kullanılarak *in vitro* mikroçoğaltım protokolü tanımlanmıştır. Kültür başlatmasında aksenik eksplantların eldesi için, ticari sodyum hipoklorit [NaOCl (ACE)] kullanılarak etkili bir yüzey sterilizasyonu protokolü tanımlanmıştır. Yüzey sterilizasyonu için apikal sürgün uçlarını %10'luk NaOCl'de 10 dakika çalkalamanın yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kültür başlatılmasında eksplantların kültüre alınma tarihleri arasında, Temmuz- Ağustos aylarında kültüre alınan eksplantların diğer aylardan daha yüksek oranda yaşayan (%32.5) kültüre sahip olduğu ortaya konmuştur. Besi ortamı (MS, SH, WPM) tipi ve bitki büyüme düzenleyici (Kinetin, 2iP, BA, TDZ) çeşitlerinin kültür başlatmaya ve sürgünlerin proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Sürgün proliferasyonu için, çalışılan sitokinin çeşitlerinden 2 mgl^{-1} BA'nın eksplant başına ortalama 2.15 adet yeni sürgün en iyi besi ortamını oluşturduğu tespit edilmiştir. Proliferasyon oranını artırmak için, en iyi sitokinin ve stokininle beraber oksin (IAA, NAA, IBA) kombinasyonları ve konsantrasyonları (0.1 ve 0.3 mgl^{-1}) denenmiştir. 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA destekli MS besi ortamının sürgün çoğaltımına en iyi cevap verme kapasitesine (eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 2.55) sahip olduğu ortaya konmuştur. *İn vitro* çoğaltımı yapılan sürgünlerin köklendirilmesine IBA, NAA, 2,4-D ve IAA gibi oksin çeşitlerinin etkileri $1mg1^{-1}$ konsantrasyonları ile araştırılmıştır. Sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi araştırmalarında 2,4-D'nin köklendirme için uygun olmadığı, NAA'nın diğer oksinlerden daha üstün bir köklendirme oranına (%70) sahip olduğu açık bir şekilde ortaya konmuştur. *İn vitro* köklendirilen bitkilerin dış ortama alıştırılması çalışmalarında steril torfun ve nemin etkili olduğu ortaya konmuştur. Steril torfta kademeli olarak nem oranı azaltılan bitkiciklerin %60 oranında yaşamaya devam ettiği ve dış koşullara adaptasyonda başarılı olduğu tespit edilmiştir.

İn vitro çoğaltılan klonlarda meydana gelebilecek varyasyonu belirlemek için, kültürün 5., 10., 15., 20., 24. alt kültürü sonrası yaprak örneklerinden DNA'lar izole edildi ve ISSR analizi yapıldı. Ana materyal ile klonlar arasında en yakın benzerlik oranının 0.838, en uzak benzerliğin 0.748 olduğunu ve 0.792 ortalama benzerlik oranı çalışılan klonlarda genetik çeşitliliğin oluştuğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Buttum, ISSR, Mikroçoğaltım, MS, NAA, *Pistacia khinjuk*

ABSTRACT

IN VITRO MICROPROPAGATION OF FEMALE KHİNJUK PİSTACHİO (*Pistacia khinjuk* Stocks) TREES

PhD THESIS

Yusuf ERSALI

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

2014

In this study, a protocol was described for the micropropagation of khinjuk pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) apical and lateral shoot tips explanted from mature trees. Effective surface sterilization method was described for the production of axenic explants from *P. khinjuk* shoots using commercial (ACE) sodium hypochlorite (NaOCl). Decontamination was best achieved when the apical buds were surface sterilized by immersion in an aqueous solution of 10% sodium hypochlorite for 10 minutes. Significant differences in explanting dates for the culture initiation were observed with the explants taken in the July-August time period showing higher living explants (32.5%) than the other periods tested. The effect of different plant growth regulators (Kinetin, 2iP, BA, TDZ) and growth medium (MS, SH, WPM) for *in vitro* culture initiation and shoot proliferation were investigated. For *in vitro* shoot proliferation, the best response was obtained in MS medium supplemented with a 2 $mg1^{-1}$ BA treatment, with a shoot number of 2.15 per explants. To optimize further the proliferation stage, one concentration of BA (2 mgl^{-1}) was used in combination with three auxin types (IAA, NAA, IBA) at different concentrations (0.1, 0.3 and mgl^{-1}). The best response for shoot proliferation was obtained from the explants cultured in the MS medium supplemented with 2 mgl^{-1} BA + 0.1 mgl^{-1} IBA with a shoot number of 2.55 per explants. For the rooting of *in vitro* regenerated shoots, different auxins (IBA, NAA, 2,4-D and IAA, each at 1 mgl^{-1}) were investigated. *In vitro* proliferated shoots were

utilized for the rooting. The rooting experiments have revealed that the cytokinin 2,4-D is not a suitable plant growth regulator (PGR) for the *in vitro* rooting of khinjuk pistachio shoots. The auxin NAA has superior rate (%70) of the rooting of shoots than the other PGRs tested. Humidity and sterile peat have been effective role for the acclimatization of in vitro regenerated plantlets. The in vitro regenerated plantlets of mature khinjuk pistachio were successfully acclimatized under in vitro conditions, with 60% survived rate when they were treated with a gradually decreasing humidity. DNAs from mother trees and micropropagated plantlets belonging to 5, 10, 15, 20 and 24 times subculture were isolated and subjected to ISSR analysis in order to evaluate their genetic stability and detect possibly existing variation among in vitro plantlets. Among mother plantlets and their regenerants for two of the clones tested, similarity ratio in the range of 0.838-0.749 indicated the presence of polymorphism within the clones studied.

Key Words: Khinjuk pistachio, ISSR, Micropropagation, MS, NAA, *Pistacia khinjuk* Stocks

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No **Sayfa**

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan besi ortamları ve içerikleri……. 29

Çizelge 3.2. Standart Murashige ve Skoog içeriği……. 31

Çizelge 3.3. Standart Schenk ve Hildebrandt içeriği……... 32

Çizelge 3.4. Standart Woody Plant Medium içeriği…… 34

Çizelge 3.5. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler…… 48

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları... …… 48

Çizelge 3.7. Polimeraz zincir reaksiyonu adımları…….. 49

Çizelge 3.8. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler……. 50

Çizelge 4.1. NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının yüzey dezenfeksiyonu üzerine etkisi……..... 52

Çizelge 4.2. NaOCl'de çalkalanma sürelerinin yüzey dezenfeksiyonu üzerine etkisi. 53

Çizelge 4.3. Kültür başlatılmasına eksplant tipinin etkisi…… 54

Çizelge 4.4. Kültür başlatılmasına sitokininlerin etkisi……... 56

Çizelge 4.5. Kültür başlatılmasına BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi…..... 58

Çizelge 4.6. Kültür başlatılmasına yılın en uygun döneminin etkisi……... 60

Çizelge 4.7. Sürgün proliferasyonuna besi ortamı tipinin etkisi…….. 62

Çizelge 4.8. Sürgün proliferasyonuna MS'in farklı kuvvetlerinin etkisi……. 64

Çizelge 4.9. Sürgün proliferasyonuna sitokininlerin etkisi…….. 65

Çizelge 4.10. Sürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi….. 68

Çizelge 4.11. Sürgün proliferasyonuna sitokinin/oksin kombinasyonunun etkisi……. 70

Çizelge 4.12. Sürgün proliferasyonuna karbonhidrat çeşidinin etkisi……... 73

Çizelge 4.13. Sürgün proliferasyonuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi... 76

Çizelge 4.14. Sürgünlerin köklenmesine farklı oksin tiplerinin etkisi……... 80

Çizelge 4.15. Sürgünlerin köklenmesine NAA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi. 82

Çizelge 4.16. Sürgünlerin köklenmesine uzunluğun etkisi..... 83

Çizelge 4.17. Bitkilerin aklimatizasyonuna torfun etkisi..... 86

Çizelge 4.18. Çalışmada kullanılan örnekler ve genomik DNA izolasyonu sonucu elde edilen konsantrasyon sonuçları……..... 87

Çizelge 4.19. Örnekler arasında ‘‘Pop Gen32 ’’ programı kullanılarak elde edilen genetik uzaklık ve genetik benzerlik değerleri…… 90

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 2.1.	Dişi *P. khinjuk* ağaçları……..	11
Şekil 2.2.	Dişi *P. khinjuk* ağacı yaprağı……..	12
Şekil 2.3.	Erkek *P. khinjuk* ağacı yaprağı……	12
Şekil 2.4.	*P. khinjuk* erkek çiçeği…….	13
Şekil 2.5.	*P. khinjuk* dişi çiçeği……	13
Şekil 2.6.	*P. khinjuk* olgunlaşmamış meyvesi……..	14
Şekil 2.7.	*P. khinjuk* olgunlaşmış meyvesi……..	14
Şekil 2.8.	Dünya'da *P. khinjuk* yayılış coğrafyası…….	16
Şekil 2.9.	Türkiye'de *P. khinjuk* yayılış coğrafyası……	16
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan eksplant tipleri……..	29
Şekil 4.1.	Dişi ağaçtan alınan yıllık sürgünlerden kültür başlatma çalışmaları……..	53
Şekil 4.2.	Kültürün 21. gününde lateral ve apikal tomurcuklar……..	55
Şekil 4.3.	Kültürün 21. gününde farklı sitokinin destekli MS besi ortamında tomurcukların gelişmesi……..	57
Şekil 4.4.	28. günde BA'nın farklı konsantrasyon etkisi…….	59
Şekil 4.5.	Sürgün proliferasyonuna besi ortamı tipinin etkisi……..	63
Şekil 4.6.	Proliferasyona sitokininlerin etkisi……..	66
Şekil 4.7.	Sürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi……..	69
Şekil 4.8.	Sürgün proliferasyonuna sitokinin/oksin kombinasyonunun etkisi…….....	71
Şekil 4.9.	Sürgün proliferasyonuna karbnohidrat çeşidinin etkisi……..	74
Şekil 4.10.	Sürgünl proliferasyonnuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi….	77
Şekil 4.11.	Sürgün proliferasyonu optimize edilmiş besi ortamı koşullarında 40. gün.	78
Şekil 4.12.	Çeşitli oksin tiplerinde geliştirilen bitkiler……..	80
Şekil 4.13.	1 mgl^{-1} NAA içeren besi ortamındakültüre alındıktan 28 gün sonra sürgünlerden gelişen köklenmiş bitkiler.....	82
Şekil 4.14.	Sürgünlerin köklenmesine sürgün uzunluğunun etkisi.....	84
Şekil 4.15.	Nem kontrolü sağlanmaya çalışılan bitki…….	86

Şekil 4.16. Saksıya aktarılmış bitki…… 87

Şekil 4.17. Dişi *P. khinjuk* ağacı kültürlerine ait genomik DNA örnekleri…… 88

Şekil 4.18. UBC 857 ISSR primeri ile 12 Dişi *P. khinjuk* ağacı örneği kullanılarak yapılan PZR ile çoğaltım sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü……. 89

Şekil 4.19. UBC 847 ISSR primeri ile 12 Dişi *P. khinjuk* ağacı örneği kullanılarak yapılan PZR ile çoğaltım sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü……. 90

Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan çeşitlerinin birbirine olan yakınlığını ve uzaklığını gösteren dendogram……. 91

Şekil 5.1. Dişi *P. khinjuk* ağacı sürgün uçlarından *in vitro* bitki üretim tekniği ana hatları……... 105

KISALTMA VE SİMGELER

MS	: Murashige ve Skoog
WPM	: Woody Plant Medium (Lloyd ve McCown)
SH	: Schenk and Hildebrand Medium
QL	: Quoirin ve Lepoivre
DKW	: Driver ve Kuniyuki
BA	: 6-Benzil adenin
Kin	: Kinetin
NAA	:Naftalen asetik asit
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: Indol bütirik asit
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
TDZ	: Thidiazuron
GA_3	: Gibberellik asit
g	: Gram
gl^{-1}	: Gram / Litre
w/v	: Ağırlık / Hacim
v/v	: Hacim/Hacim
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
mgl^{-1}	: Miligram / Litre
µl	: Mikro litre
µm	: Mikrometre
ng	: Nanogram
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
NaOCl	: Sodyum hipoklorit

CaOCl	: Kalsiyum hipoklorit
ºC	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
bç	: Bazçifti
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromid
dH2O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EtOH	: Etil alkol
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
gDNA	: Genomik DNA
ISSR	: Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
kb	: Kilobaz
ml	: Mililitre
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
MSAP	: Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm
NaCl	: Sodyum klorür
PCR (PZR)	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIC	: Polimorfik Bilgi İçeriği
PVP	: Polivinilprolidon
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	: Dakikada dönüş hızı
SSR	: Basit Tekrarlı Diziler
TRIS-HCl	: 2-amino-2-hidrokismetil-1,3-propandiol-hidroklorikasit

TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
SCAR	: Karakterize edilmiş bölge dizisi çoğaltımı

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun beslenmesinde en çok kullanılan yaklaşık 30 bitki grubu içinde meyve ağaçları da bulunmaktadır. Bitkilerin insan ve hayvan beslenmesinde kullanım amacıyla yetiştirilmesi, klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer tarımsal teknikler kullanılarak üretim, tohum-bitki-tohum döngüsünde eşeyli çoğalma ile gerçekleştirilir. Tarımsal üretimin geçmişi düşünüldüğünde devrim olarak adlandırılan iki önemli dönem mevcuttur. Bunlardan birincisi, üstün varyetelerin elde edilmesi, ticari gübreler ve ileri tarımsal tekniklerin uygulanmasıyla ortaya çıkan yeşil devrim (green revolution), diğeri de özellikle son 20 yılda etkisi gittikçe artan ve bitki biyoteknolojisinin uygulanmasıyla ortaya çıkan gen devrimi (gene revolution)'dir. Yeşil devrimde üretim tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleştirilmiş, DNA'nın yapısının anlaşılması, bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devrimi döneminin başlamasını hızlandırmıştır. Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahında kullanılan başlıca uygulama alanları arasında; türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürleri, haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürleri, somaklonal varyasyonlar, *in vitro* seleksiyonlar, germplazm muhafazaları, somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu) ve gen transferleri ile hastalıksız bitki eldesinde meristem kültürleri, mikroçoğaltım, sentetik tohum (somatik embriyolar) üretimi, kallus-hücre süspansiyonlarıyla sekonder metabolit üretimi ve kimerik bitki oluşturmak sayılabilir (Babaoğlu ve ark. 2002). Genetik olarak değiştirilmiş 70'ten fazla bitki türünün hepsinde bir takım doku kültürü teknikleri uygulanmıştır (Brown ve Thorpe 1995).

Dünyada bahçecilik ve tarımda belli bir özellik ya da özellikleri gösteren, genetik olarak aynı yapıya sahip hatların kullanılması yetiştiriciler için istenen bir durumdur. Bu, çiçek rengi, ürün miktarı ve büyüklüğü ya da diğer pazarlanabilir ayırt edici özellikler olabilir. Bitkilerin bir nesilden diğerine genetik olarak değişmeden devam ettirilebilmesi sonucu aynı bitkilerin elde edileceğinin bilinmesi üreticiler için büyük bir avantajdır. Genetik olarak aynı özellikleri taşıyan bireyleri ya da klonları devam ettirmenin tek yolu vejetatif üremeye başvurmaktır. Bahçıvan ve bitki üreticileri düzenli olarak basit çelikler yapmayla bitkileri vejetatif olarak yeniden üretir. Çelikler kök oluşturmaya teşvik edilerek dikilir. Vejetatif üreme için diğer yaygın bir yöntem

biyoteknolojik bir uygulama olan mikroçoğaltımdır. Mikroçoğaltımda bitki doku kültürü teknikleri kullanılır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku bitki veya bitkisel ürünlerin yetiştirilmesidir. Bitki doku kültürü işlemlerinde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan, meristematik olmayan somatik hücrelerden ve mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden yapılabilir. Microçoğaltım; Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından yapay besi ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanır (Babaoğlu ve ark. 2002).

Doku kültüründe, küçük bir bitki parçası kesilerek aseptik ya da bakterisiz bir cam şişe ya da cam kabında sentetik bir kültür ortamında yerleştirilir. Ortam genellikle jelleştirici olarak agar ve karbon kaynağı olarak da sukrozla desteklenir. Ek olarak bazı vitaminler temel mineraller ve hormonları içerir. Bu şartlar altında hücreler bölünmeye başlar ve kallus olarak adlandırılan farklılaşmamış hücre yığını oluşturur. Hormon dengesinin sık sık değiştirilmesi ile kültür şartlarının ayarlanması kallusun sürgün ve kökten oluşan bitkiciklere dönüşmesini sağlar. İlk olarak kökler ve sürgünler oluşur bu bitkicikler cam şişeden alınarak serada dikilir. Bitkicikler serada büyür, çiçeklenir, tohum oluşturur ve normal olarak bitkilerin diğer yaptığı her şeyi yaparak yaşamını sürdürür. Mikroçoğaltımın mevsimsel engelleri ortadan kaldırarak yılın her gününde bitki üretimine imkan vermesi, az bir alana ihtiyaç duyması, sınırlı sayıda materyalle kısa sürede çok daha fazla bitki elde etmeye imkan vermesi ve kolaylıkla kontrol edilebilir ortamlar sunması nedeniyle, gelenenksel bir yöntem olan çelikle çoğaltımdan daha avantajlıdır. Mikroçoğaltım ağaç türlerinin üretiminde de yaygın bir şekilde kullanılır çünkü, yöntemde tohumların toplanması ve çimlenmesi gibi zahmetli işlemler yoktur. Hatta üstün karakterli ağaçlar daha yüksek verimler için klonlanır (Hopkins 2006).

Anaçların istenen özelliklerinden biri şiddetli kış donlarına dayanıklılıktır. Böyle kışları sağlıklı bir şekilde atlatmış olan anaçların seçilmesi soğuğa daha dirençli anaçların elde edilmesini sağlar. Bir meyve bahçesinde geçici kuraklıktan uygun bir sulama sisteminin kurulmasıyla kaçınılabilir. Ancak Dünya'nın bir çok bölgesinde su az bulunan ve pahalı bir kaynaktır. Organik sistemlerde herbisit kullanmadan elde edilen

ürünlerin benimsenmesi organik tarımı artırmış ancak bu durum yabancı otların artmasına neden olmuştur. Yabancı otlarla su ve mineraller için etkili bir şekilde yarışan ve suyu verimli kullanan anaçlar gelecekte organik tarım sisteminde daha önemli olacaktır. Anaçların hangi özelliklerinin önemli olduğu alanın iklimi, toprak durumu ve meyve yetiştiricilerin kullandığı sistemlerin yönetimine göre değişiklik gösterir. Gelecekte toprak kaynaklı zararlı ve hastalıklara direnç, kuraklığa tolerans hatta toprağa tutunma ve toprak kaynakları için kuvvetli köklenme gibi özelliklerin öneminin artacağı varsayılmaktadır. Kimyasal pestisitlerin kullanımdan çekilmesi, su kullanımında sınırlamalar ve üretimde organik tarım gibi daha sürdürülebilir sistemlere eğilim önceliklerin değişiminde önemli etken olmaktadır (Carlson 2002).

Pistacia vera L. (antepfıstığı) *Pistacia* cinsinde bulunan diğer türlere göre büyük bir farkla ekonomik olarak en önemli türdür. Antepfıstığının değeri giderek artmaktadır ve günümüzde bir yılda yaklaşık olarak 2 milyar dolarlık ürün hasat edilmektedir. Halen Dünya'da antepfıstığı üretiminin % 98'i İran (%46.95), Amerika Birleşik Devletleri (%23), Türkiye (14.92), Çin (7.36) ve Suriye'de (%5.69) üretilmektedir (FAO 2012). Antepfıstığı yenebilir tohumlara sahip olduğu için oldukça büyük bir ticari öneme sahiptir. Antepfıstığı çoğunlukla kabuklu bir şekilde taze olarak tüketilirken şekerleme, fırınlanmış yiyecekler ve dondurmada işlenmiş olarak kullanılır (Tous ve Ferguson 1996).

Pistacia khinjuk Stocks (buttum) antepfıstığı gibi ekonomik açıdan çok önemli bir kültür bitkisinin doğal anacı olmasının yanında, aşılamada kolaylıklar sunması, kültür çeşitleri ile iyi uyuşması, üzerine aşılanan çeşitleri geliştirme bakımından iyi sonuç vermesi bakımından önemli bir türdür.

P. khinjuk özellikle kök boğazı ve topraktan 10 cm yükseklikteki aşı noktası diğer türlere göre daha kalın olduğundan aşılamada kolaylık sağlamaktadır. Buttum anaçları düzgün gövde oluşturur. *P. vera* ve *Pistacia atlantica* Desf. çöğürleri daha uzun boylu olmalarına rağmen, aşı yerinde gövde çapları fazla gelişmemektedir (Tekin ve ark., 2001). Türkiye'de buttumun anaç olarak kullanılması su stresine gösterdiği direnç, kök-ur nematodlarına (*Meloidogyne* cinsi) gösterdiği tolerans, zayıf topraklara adaptasyonu gibi karakteristik özellikleridir (Tilkat ve ark. 2005). Kültür çeşitleriyle daha uyumlu bir gelişme gösteren buttum anaçları arasında aşıda uyuşmazlık

bulunmamaktadır. Toprak istekleri bakımından daha seçici olan *P.atlantica'*ya oranla *P. khinjuk* anaçlarının taşlı, kireçli, toprak koşullarına uyumu daha iyidir (Ayfer ve ark. 1990). Antep fıstığı gerek üretim gerekse ihraç kapasitesi yönünden ülkemizin önemli ürünlerinden birisidir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi, ülkemizin antepfıstığının gen merkezi üzerinde oluşu ve ülkemiz ekolojik şartlarında çok iyi yetişmesidir. Özellikle diğer kültür bitkilerinin yetişmediği veya yetiştiriciliğinin ekonomik olarak yapılamadığı kıraç, taşlık, kayalık ve meyilli arazilerde yetişen bir bitki olması, bu meyve türünün ülkemizdeki önemini daha da artırmaktadır. Antepfıstığının üretiminin artırılması önemli bir ekonomik kaynaktır. Yeni antepfıstığı bahçelerinin kurulması veya yabani antepfıstığı anaçlarının aşılanmasıyla üretimi artırmak mümkün olacaktır (Kuru ve Özsabuncuoğlu 1990).

P. khinjuk Türkiye, Suriye, Irak, İran, Mısır, Afganistan ve Pakistan'da doğal olarak bulunmakla birlikte çoğunlukla taşlı yerlerde ve kayalık dağ arazilerde, kuru step-orman veya bozkır oluşumlarının olduğu kurak ve yarı kurak bölgelerde yetişmektedir (Padulosi ve Hadj-Hassan 2001, Mehrnejad 2003).

P. khinjuk yabani olarak yetiştirilir ve tohumları taze olarak tüketilir, yağı çıkarılır ve sabun yapımında kullanılır (Al-Saghir 2009). Gölgelik, süs bitkisi ve rüzgar kesici olarak da kullanılır (Joley 1953). Buttumdan elde edilen uçucu yağın antihelmitik özellikte olduğu ve kullanılan başlıca ilaçlar gibi yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Taran ve ark. 2009). Buna ek olarak *P. khinjuk* yaprak özütlerinin antifungal ve antibakteriyel etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Taran ve ark. 2010). Ayrıca buttumdan izole edilen bazı bileşiklerin antienflamatuar (iltihap sökücü) özelliğe sahip olduğu deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (Esmat ve ark. 2012). Taghvaeefard ve Sadeghi (2014), tarafından yapılan çalışmada, *P. khinjuk* yaprak özütlerinin bazı yabancı ot türlerinde tohum çimlenmesini % 95 oranında engellediği ve yabancı ot mücadelesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. *P. khinjuk* ve *P. atlantica* reçinesi ve toprak üstü organlarının yakılması sunucu dumanın tüttürülmesi ile keçide kıl dökülmesine karşı, çoğu hayvanda öksürük tedavisinde, koyunlarda döllenme döneminde kızıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Bahmani ve Eftekahri 2012). İran'da geleneksel olarak mide rahatsızlıkları, yol tutması, bulantı ve kusmada *P. khinjuk* reçinesi kullanılmaktadır (Salehi-Surmaghi 2010). İran'da doğal olarak yayılış gösteren *P. khinjuk* reçinesi

Bakhtiari bölgesinde sindirim güçlüğünde, vücudu kuvvetlendirmede, diş ağrısında ve kanamayı durdurucu madde olarak geleneksel tıpta kullanılmakla beraber meyveleri yabani meyve olarak tüketilmektedir (Ghasemi ve Aghaee 2011). *P. khinjuk* çerez (tuzlanıp kavrularak) olarak da tüketilir (Esmail-pour 1998).

Günümüzde geleneksel olarak antepfıstığı anaçları tohumları ile çoğaltılmaktadır. Ayfer ve Serr (1961) tarafından, *Pistacia* türlerinin tohumlarında çimlenme oranının beklenenden çok düşük düzeyde olduğu ve bu durumun üreticiler için önemli bir problem olduğu vurgulanmaktadır. Antepfıstığı anaçlarına ait tohumların çimlenme ve köklenme sorunları anaç çoğaltımında büyük engeller yaratmaktadır (Rahemi ve Baninasab 2000). Ayrıca anaç üretiminde geleneksel metotlar ile tohumdan yetiştirilen anacın istenen özelliği taşıyıp taşımadığını belirlemek çok uzun yıllar alır. Bu nedenle üreticiler eşeyli çoğalmadaki güçlükler ve bitki ve üründe istenmeyen çeşitlilikler nedeniyle eşeysiz çoğalmanın avantajlarını kullanmaktadır (Graham ve ark. 2003). Bunun yanısıra tohumdan yetişen bir anacın hangi özelliklere sahip olacağını önceden bilmek şimdiki tekniklerle mümkün değildir. (Carlson 2002). Antepfıstığı üretiminde uygun anaçların seçimi ve bu anaçların verim ve kalite üzerindeki etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır (Ayfer ve ark. 1990).

Antepfıstığının doğal bir anacı olan *P. khinjuk*'un anaç elde etmede kullanılması bu türü önemli hale getirmektedir. Anaç elde etmede geleneksel bir metod olan tohumların çimlendirilmesi yöntemi kullanılır. Fakat, bu yöntem eşeyli çoğalmadan dolayı farklı genotipli anaçların elde edilmesine, çok geniş alanlara ve büyük bir iş gücüne ihtiyaç duymaktadır. Az bir alan ve zaman kullanılarak tek tip genotipli bitkiciklerin elde edilmesinin en yaygın yöntemi doku kültürü teknikleri ile mikroçoğaltım yöntemidir (Karishna-pillay 2000).

Türkiye karmaşık iklim yapısı içinde, özellikle küresel ısınmaya bağlı olarak görülebilecek bir iklim değişikliğinden en fazla etkilenecek ülkelerden biridir. Türkiye'nin farklı bölgeleri iklim değişikliğinden farklı biçimde ve değişik derecelerde etkilenecektir. Sıcaklık artışından etkilenecek bölgelerden biri kurak ve yarı kurak bir bölge olan Güney Doğu Anadolu bölgesidir (Türkeş 1998). Meydana gelecek iklim değişiklikleri, tarımsal faaliyetlerde hayvan ve bitkilerin doğal yaşam alanlarında değişikliklere yol açacak, özellikle yukarıda belirtilen bölgelerimizde, su kaynakları

bakımından önemli sorunlar ortaya çıkacaktır. Hemen hemen bütün iklim bilimcilerinin üzerinde birleştiği ortak nokta ise gelecekte olabilecek iklim değişikliğinin, küresel ısınmadan kaynaklanacağıdır (Öztürk 2002). Ekonomik öneminin yanısıra Güneydoğu Anadolu bölgesi iklimine uyum sağlamış kurak, meyilli ve taşlık arazide doğal olarak yayılış gösteren ağaç türlerinin (buttum, meşe, yabani badem) uygun yerlere dikimi, gelecek yıllarda kuraklığın neden olduğu olası bir kıtılık döneminde büyük bir avantaj sunabilir. Çünkü bu ağaç türleri belli bir zaman periyodu boyunca birçok canlı için besleyici maddeler sunabileceğinden hayati bir öneme sahip olur.

P. khinjuk Türkiye'de Güneydoğu Anadolu bölgesinde doğal bir şekilde yayılış göstermektedir (Yaltırık 1967, TUBİVES 2014). Bu bölgedeki iklimsel koşullara ve araziye uyum sağlamış olan *P. khinjuk*'un yeni fıstık bahçelerinin kurulmasında anaç olarak kullanılması gelecekte daha uzun ömürlü ve daha verimli bahçelerin var olacağı anlamına gelmektdir. İklimsel olarak kurak ve yarı kurak olan bu bölgede antepfıstığı yetiştiriciliği, beslenme ve tarımsal ekonomi açısından oldukça önemlidir. Antepfıstığı için önemli bir anaç olan *P. khinjuk* fidanları ya tohumdan yetiştilir ya da vejetatif olarak çoğaltılır. Tohumdan yetiştirilen anaçlar istenmeyen özelliklere sahip olabileceğinden, biyotik ve abiyotik stresleri başarıyla atlatmış seçkin anaçların vejetatif olarak çoğaltılması daha dayanıklı genotipe sahip bireylerin elde edilmesine imkan sağlayacaktır. *Pistacia* türleri vejetatif olarak çelikle çoğatımında başarı elde edilemediği için (Guerrero ve ark. 2002, Gijón ve ark. 2010) klon bitkiler *in vitro* koşullarda bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak elde edilebilir.

Somatik hücrelerin *in vitro* rejenerasyonu mitotik bölünme ile gerçekleşmektedir bu eşeysiz üremedir. Klonal çoğaltım amacı ile kullanılan *in vitro* teknikler mikroçoğaltım teknikleri olarak da ifade edilmektedir. Amaç aynı genetik yapıda bitkiler üretmektir. Ancak bu tekniklerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar da ortaya çıkmaktadır. Bu tür varyasyonlar doğal olarak meydana gelmektedir ve bunlar ya hücredeki genetik değişimler ya da hücre ve dokulardaki geçici değişimler olarak ifade edilmektedir. Mikroçoğaltım amacı ile yürütülen çalışmalarda varyasyonlar istenmez. Bu nedenle mikroçoğaltımda en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır (George 1993). Somaklonal

varyasyon, *in vitro* koşullarda rejenere olan bitkiler arasında ortaya çıkabilen, genetik (Evans 1988) veya epigenetik kökenli değişikliklerdir (Li ve ark. 2008).

İn vitro koşullarda oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesi amacıyla, DNA temelli birçok farklı moleküler belirteç kullanılmaktadır. Genom dizisinde oluşan farklılıkların tespit edilmesi için en çok kullanılan belirteçler; RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Williams ve ark. 1990), ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi, Zietkiewicz ve ark. 1994) ve AFLP (Çoğaltılmış Parçaların Uzunluk Polimorfizmi, Vos ve ark. 1995) tekniklerinin kullanımı tercih edilmektedir.

Özellikle tez konusunu oluşturan *P. khinjuk* türüne ait olgun materyalin mikroçoğaltımı sonrası genetik kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışma ilk defa bu tez kapsamında yapılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda yaşatılan dişi *P. khinjuk* klonlarında somaklonal varyasyonların belirlenmesi için ISSR tekniği kullanılmıştır.

Doğal yaşam alanında tohumdan çimlenip yetişmiş olan bir anacın genetik olarak daha rekabetçi olduğunu tahmin etmek çok zor değildir. Bu anacın ağaç formundan elde edilecek olan klonlar teorik olarak aynı özelliklere sahip olur. İstenilen özelliklere sahip olgun bir anaçtan (*P. khinjuk*) hem daha ekonomik hem de daha kısa bir sürede seçkin genotipli klonlar elde edebilmek için mikroçoğaltım protokolüne ihtiyaç vardır. Amacımız, Türkiye'de antepfıstığı için önemli bir anaç olan *P. khinjuk* ağaçlarının *in vitro* mikroçoğaltım protokolünü geliştirmektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *P.khinjuk* Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Orijini

Kökeninin 80 milyon yıl önce Orta Asya'ya dayandığına inanılan (Parfitt ve Badenes 1997, Kafkas ve Perl-Treves 2001, AL- Saghir 2009) *Pistacia* L. cinsi için iki farklı gen merkezi tanımlanmıştır. Birincisi Güney Avrupa'nın Akdeniz bölgesi, Kuzey Afrika ve Orta Doğudan oluşur. İkincisi Batı ve Orta Asya'dan oluşur (Kafkas ve ark 2002, AL-Saghir 2009). Cinsin türleri Kuzey Afrika'dan Filipin'lere ve Teksas'tan Nikaragua'ya doğal olarak yayılmıştır.

Bundan 45.000-10.000 yıl önce üst paleolitik çağda Dicle nehrinin kolu üzerinde bulunan Hallan Çemi civarında yaşayan insanların meşe, yabani badem, yabani baklagiller *P. khinjuk* gibi ürünleri toplayarak beslendiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Rosenberg ve ark. 1998).

Tilkat (2003) tarfından, ‘‘tarımsal üretimle ilgili olarak 1874 Diyarbekir Vilayet Salnamesi'nde o dönemde Diyarbekir'e bağlı olan Siirt sancağında, Buttum üretiminin yılda 150 bin okkayı (1 okka: 1.282 kg) bulduğuna işaret etmektedir'' bildirilmiştir. Günümüzde *P. khinjuk* tohumu üretimi ile ilgili bir bilgiye rastlanmamaktadır. Mardin, Siirt illerinde meyveleri yerli halk tarafından doğadan toplanarak yağı çıkarılıp sabun yapımında kullanılmaktadır. Sabun bıttım sabunu olarak yurdun her yerinde satılmaktadır. Ancak *P. khinjuk* tohumlarının kaç kilogram toplandığı, sabun yapımında ne kadar kullanıldığı ve bu sabun satışının ticari hacmi ile ilgili resmi bir bilgiye ulaşılamamaktadır.

2.1.2.Taksonomik Tarihi

Linnaeus, *Pistacia* cinsini tanımlamış olan ilk kişidir (Linnaeus 1753). Linnaeus bu cinsin üç türünü teşhis etmiştir. Bu türler, *Pistacia lentiscus, Pistacia terebinthus* ve *Pistacia vera*'dır. Linnaeus'tan önce Tornefort (1700), *Pistacia terebinthus* ve *Pistacia vera*'yı *Terebinthus* cinsi altında sınıflandırırken *Pistacia lentiscus*'un farklı bir cins (*Lentiscus*) olduğunu düşünmüştür. Desfontaines (1799), *Pistacia atlantica*' yı *Pistacia* cinsinin yeni bir türü olarak tanımlamıştır. Humbolt ve ark. (1824), *Pistacia*

mexicana'yı *Pistacia*'nın yeni bir türü olarak tanımlamıştır. de Candolle (1825), cinsle ilgili yapmış olduğu revizyonda *Pistacia atlantica* Desf. ve *Pistacia mexicana* H.B.K. Bunge (1835) türlerini sonradan fark etmiş ve *Pistacia chinenesis* adında yeni bir tür tanımlamıştır; Fischer ve Meyer (1838), *Pistacia mutica* olarak yeni bir tür tanımlamıştır; Boissier (1849)'da yapmış olduğu çalışmada *Pistacia palaestina* adında yeni bir tür tanımlamıştır; Stockmans ve Hooker (1852), *Pistacia khinjuk* olarak yeni bir tür eklemiştir. Marchand (1869), *Pistacia* cinsini yeniden gözden geçirdiğinde *Pistacia intergerima* adında yeni bir tür tanımlamıştır.

Pistacia cinsinin ilk monografik çalışması (Engler 1883) tarafından yapılmış ve sekiz türün olduğu tespit edilmiştir: *Pistacia atlantica, Pistacia chinensis, Pistacia khinjuk, Pistacia lentiscus, Pistacia mexicana, Pistacia mutica, Pistacia terebinthus,* ve *Pistacia vera. Pistacia* cinsine, Engler'den sonraki araştırıcılar tarafından birkaç tür daha eklenmiştir: Martelli (1886) *Pistacia falcata,* Franchet (1886) *Pistacia weinmannifolia* ve Swingle (1920) *Pistacia texana.*

Zohary (1952) tarafından yapılan morfolojik çalışmada *Pistacia* cinsi11 tür ve 4 seksiyona ayrılmıştır: *Lentiscella* Zohary (*Pistacia mexicana* Humb., Bonpl. & Kunth ve *Pistacia* texana Svingle); *Eu Lentiscus* Zohary (*Pistacia lentiscus* L., *Pistacia saportae* Burnat, *ve Pistacia weinmannifolia* Poiss. ex Franch.); *Butmella* Zohary (*Pistacia atlantica* Desf.); ve *Eu Terebinthus* Zohary (*Pistacia chinensis* Bunge, *Pistacia khinjuk* Stocks, *Pistacia palaestina* Boiss., *Pistacia terebinthus* L., ve *Pistacia vera* L.). Zohary (1952)'nin değerlendirmesinden sonra birkaç yeni tür *Pistacia* cinsine eklenmiştir. Yaltırık (1967) Türkiye'deki *Pistacia* türlerini sınıflandırmış ve *Pistacia eurycarpa* isminde yeni bir tür tanımlamıştır. Bu tür Zohary tarafından *Pistacia atlantica* var. *kurdica*'nın bir sinonimi olarak adlandırılmıştır. Zohary *Pistacia palaestina*'nın farklı bir tür olduğunu söylerken Yaltırık (1967), *Pistacia terebinthus*'un bir varyetesi odluğunu ileri sürmüştür. Kokwaro Doğu Afrika'da *Pistacia aethiopica* adında yeni bir türü tanımlamıştır (Kokwaro ve Gillett 1980).

Pistacia cinsinde yapılan en son revizyonda 15 tür yayınlanmıştır. Bu cins *Pisatacia* ve *Lentiscella* olmak üzere iki seksiyona ayrılmıştır. *Pistacia* seksiyonu: *Pistacia atlantica, Pistacia chinensis, Pistacia eurycarpa, Pistacia falcata, Pistacia integerrima, Pistacia khinjuk, Pistacia mutica, Pistacia palaestina, Pistacia terebinthus, Pistacia vera* türlerini, *Lentiscella* seksiyonu ise: *Pistacia aethiopica, Pistacia lentiscus,*

Pistacia mexicana, Pistacia texana ve Pistacia weinmannifolia türlerini içerdiği rapor edilmiştir (AL- Saghir 2010, 2012).

2.1.3. *P. khinjuk*'un Sistematikteki Yeri

Pistacia L. Sapindales takımına ait Anacardiace (sakız ağacıgiller) familyasının bir cinsidir (Stevens 2008). *P. khinjuk*'un sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (TUBİVES 2014) .

Aile : Anacardiaceae

Cins : *Pistacia* L.

Tür : ***Pistacia khinjuk*** Stocks

- Alem ***Plantae***
  - Altalem ***Tracheobionta***
    - Bölüm ***Magnoliophyta***
      - Sınıf ***Magnoliopsida***
        - Altsınıf ***Rosidae***
          - Takım ***Sapindales***
            - Aile ***Anacardiaceae***
              - Cins ***Pistacia***
                - Tür ***Pistacia khinjuk*** Stocks

2.1.4. Biyolojisi

2.1.4.1. Ağaç Özelliği

2–5(10) m yüksekliğinde olabilen ve kışın yaprak döken, dioik ve kurakçıl ağaçlardır. Ağaçlar iyi gelişmiş dikey reçine kanallarına sahiptir (Yaltırık 1967, Al-Saghir 2006).



Şekil 2.1. Dişi *P. khinjuk* ağaçları (Batman Batı Raman bölgesi, Eylül 2013)

2.1.4.2. Yaprak Özelliği

Yapraklar imparipennat, 11-17.7 cm uzunluğunda 8–15.5 cm genişliğinde ve zarsıdır; yaprak sapı köşeli ya da yuvarlaktır. Yaprak ekseni kanatsız, yaprakçık sayısı 1–9 arasındadır. Yaprakçılar 4.5–8.5 cm uzunluğunda 1.5–4 cm genişliğinde, ortalama değer 2.3–1, diziliş karşılıklı, altkarşılıklı, yaprakçık şekli ovattan geniş ovata kadar, yaprakçık tepesi akuminat, yaprakçık tüysüzdür; uçta bulunan yaprakçık 2.9–8.5 cm uzunluğunda, 1.2 – 4 cm genişliğinde ve çoğunlukla yanda bulunan yaprakçıktan daha büyüktür (Yaltırık 1967). (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Dişi *P. khinjuk* ağacı yaprağı (Batman Batı Raman bölgesi, Nisan 2013)



Şekil 2.3. Erkek *P. khinjuk* ağacı yaprağı (Batman Batı Raman bölgesi, Nisan 2013)

2.1.4.3. Çiçek Özelliği

Stamenli çiçekler bileşik salkımlı 9 cm uzunluğa kadar olabilen zayıf dallanmış, brakteler büyük ve beyaz tüylü; çiçekler koyu kırmızıdır (Şekil 2.4). Pistilli çiçekler bileşik salkımlı 16 cm uzunluğa kadar olabilen, tabandan dallanmış, toplu, tüysüz olabilecek kadar çok az tüylüdür (Yaltırık 1967). (Şekil 2.5).



Şekil 2.4. *P. khinjuk* erkek çiçeği (Batman Batı Raman bölgesi, Nisan 2013)



Şekil 2.5. *P. khinjuk* dişi çiçeği (Batman Batı Raman bölgesi, Nisan 2013)

2.1.4.4. Meyve Özelliği

Meyveleri drupadır (eriksi meyve). Meyve rengi koyu yeşildir (Şekil 2.7) Meyveleri biraz basık küremsi şekilli (basık yuvarlak), 6.6- 12.3 mm uzunluk ve 4.8 - 9.6 mm genişliktedir (Tekin ve ark. 2001). 100 Dane Ağırlığı "gr" olarak 40.01 gr'dır ve meyvelerin dış kabuk rengi yeşildir (Gökçe ve Akçay 1993).



Şekil 2.6. *P. khinjuk* olgunlaşmamış meyvesi (Batman Batı Raman bölgesi, Ağustos 2013)



Şekil 2.7. *P. khinjuk* olgunlaşmış meyvesi (Batman Batı Raman bölgesi, Kasım 2013)

-Filogeni. *P*. vera'nın en yakın akrabasıdır (Al-Saghir 2012)

-Fenoloji. Çiçeklenme mart ile mayıs arasında; Döllenme nisan ile ekim arasındadır (Zohary 1952).

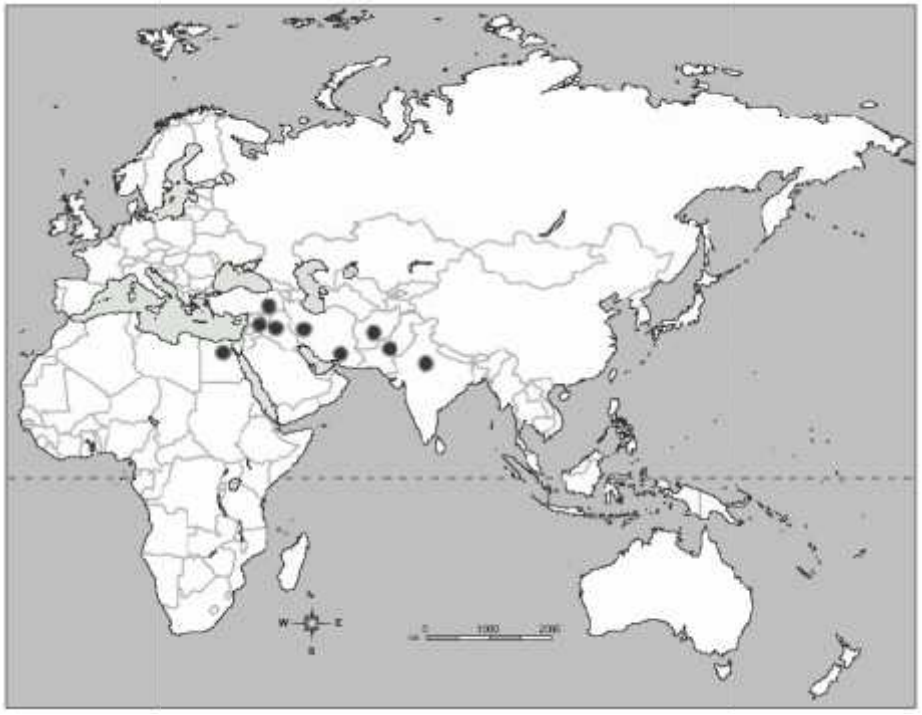
-Habitat ve ekoloji. 400 – 2400 m rakımda; Kayalık kireçli eğimli, kumlu verimli, ve granitli topraklarda yetişir (Al- Saghir 2006)). Afganistan, Pakistan, İran, Irak, Türkiye, Suriye ve Mısır'da doğal olarak yayılış gösterir bu tür çoğunlukla taşlı yerlerde ve kayalık dağ arazilerde, kuru step-orman veya bozkır oluşumlarının olduğu kurak ve yarı kurak bölgelerde yetişmektedir (Padulosi ve Hadj-Hassan 2001, Mehrnejad 2003).

- Kromozom sayısı. 2n= 24 (Ghaffari ve Harandi 2002)

- Kullanımlar. Afganistan: ''Kuru meyvesi fırında kavrularak yenir''(*Aitchison* 234–606). ''Tohumlarından yağ elde edilerek aydınlatmada kullanılır'' (*Thesiger*1760). Irak: ''Çekirdek içi yenir (meyvenin etli kabuğu acı olduğu için yenmez)'' (*Just* 1643). Pakistan ''Tohumlar yenir'' (*Ghafoor&Goodman* 4586). Suudi Arabistan: '' Ovaryumdan gelişerek henüz meyve çekirdeği ile kaplanmamış tohum içeren yumuşak meyvelerin kırmızı olanlrı yenir'' (*Collenete* 710).

-Yaygın isimler. Gulungoor, Gwun, Khinjuk, Shurumma (Afganistan), Ushgai Buzgai (Baluchistan) (Zohary 1952). İran: Baneh (*Popov* 51/203); Guan (*Léonard* 5889); Khenjuk yada Kelkhong (Ghasemi 2009) Irak: Butum, Gazwan (Kürtçe), Habbat (*Just* 1643). Pakistan: Gwan (*Ghafoor&Goodman* 4936); Ushgai (Puştuca) (*Wace* 3693). Türkiye'de Bıdım, Bıtım, Bıttım, Buddum, Butum, Gizven (Mardin) olarak ta değişik yörelerde adlandırılır (Tilkat 2003)

-Yayılış. Türkiye, Mısır, Suudi Arabistan'ın güneyinde, Tacikistan, Afganistan, Pakistan ve Nepal'in doğusunda yayılış gösterir (Al-Saghir 2006).



Şekil 2.8. Dünya'da *P. khinjuk* yayılış coğrafyası (Al- Saghir 2006)



Şekil 2.9. Türkiye'de *P. khinjuk* yayılış coğrafyası (Yaltırık 1967b, TUBİVES 2014)

2.1.4.5. Anaç Özelliği

Ülkemizde en çok *P. vera*'nın Uzun ve Kırmızı çeşitlerinin tohumlarından üretilen fideler kullanılmaktadır (Ayfer ve ark. 1990). Türkiye'de yetişen çeşitler içerisinde, Siirt çeşidinin aşı kalınlığına daha hızlı ulaştığı saptanmıştır (Tekin ve ark., 2001). Joley (1953), *Pistacia vera* tohumlarından elde edilen fidelerin toprak nematodlarına dayanıklı olduğunu belirtmektedirler. *P. vera*, *Verticillium dahliae* hastalığına hassas olması nedeniyle iyi anaç özelliğinde değildir ve son yıllarda anaç olarak önerilmemektedir.

Anaç olarak kullanılan *Pistacia* türleri içerisinde topraktaki azottan en iyi yararlanan türün *P. khinjuk* olduğu belirlenmiştir (Bilgen 1968).

P. vera ve *P. atlantica* çöğürleri daha uzun boylu olmalarına rağmen, aşı yerinde gövde çapları fazla gelişmemektedir. Ancak *P. khinjuk* anaçları aşı yerinde düzgün gövde oluşturur (Tekin ve ark. 2001).

Kuru koşullarda yapılan çalışmalarda üzerine aşılanan çeşitleri geliştirme ve taç oluşturma bakımından *P. atlantica* ve *P. khinjuk P. vera'*ya göre daha iyi sonuç vermektedir (Ulusaraç 1992).

Aşılamada *P. khinjuk*'un kültür çeşitleri ile uyuşması ve aşı noktasında herhangi bir şişkinlik ya da gelişme farklılığının görülmemesi *P. khinjuk*'u istenen bir anaç yapar (Özbek 1978, Tekin ve ark. 2001). *P. khinjuk* anacının kök sistemi kuvvetlidir, killi ve kireçli toprakları sever ve nematodlara karşı iyi derecede dayanıklılık gösterir (Gökçe ve Akçay 1993).

Hormaza ve Wünsch (2007), anaç olarak ıslah çalışmaları ve üretim programları *P. vera* türünde geliştirilmiş olup, daha ileri ıslah programlarını çapraz ıslah sonucu gelişmiş seçimlerle değerlendirilmiştir. Bu çalışmalara Kaliforniya Üniversitesi'nde başlanmış (Parfitt ve ark. 1995, Chao ve ark. 2003); İspanya'da IRTA Mas Bove (Vargas ve ark. 2002), ve Türkiye' de Antepfıstığı Araştırma İstasyonu'nda (Mehlenbacher 2003). İran, İsrail veya Avustralya gibi diğer ülkelerde mevcut antepfıstığı ıslahı yerel bitki popülasyonlarını ve türlerini içermektedir. (Mehlenbacher 2003). İran da, yağ üretimi için ıslah potansiyeli lokal genotip olan *P. atlantica* belirlenmiştir (Arefi ve ark. 2006).

Antepfıstığı, yenilebilir meyvesi için yetiştirilmektedir ve klonal çoğaltılmış aşı kalemlerinin damızlık olarak; bazı türler veya diğer *Pistacia* türleri veya hibritlerine aşılanmasına dayanır (Hormaza ve Wünsch, 2007).

Türkiye'de farklı genotiplerin başarımı *P. vera, P.atlantica, P. terebinthus ve P. eurycarpa* değerlendirilmektedir. *P. vera* anaçları ve *P. vera X P. khinjuk* melezleri anaç ıslahı için de kullanılmaktadır (Kafkas ve ark. 2006c, Atlı ve Kaşka 2002). Antepfıstığı daha çok tohumdan üretilmektedir. Bu alandaki önemli gelişmeler mikroçoğaltım alanında yapılmıştır (Parfitt ve Almehdi 1994, Özden-Tokatlı ve ark. 2010). UCB-1 anacının (*P. atlantica* x *P. intergerrima* melezi) *y*aprak kesitlerinden klonal çoğaltımı Kaliforniya'da yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Almehdi ve ark. 2002).

1976 yılında dikilmiş, 3 antepfıstığı anacı (*P. vera*, *P. khinjuk* ve *P. atlantica*) üzerine aşılı 6 antepfıstığı (Uzun, Kırmızı, Halebi, Siirt, Ohadi ve Kellekoçi) çeşitlerinin meyveleri kullanılmıştır. Çeşitlerin salkımdaki meyve sayılarının *P. khinjuk* anacı üzerinde en fazla olduğu, bu anacı *P. atlantica*'nın takip ettiği, salkımdaki meyve sayısının en az *P. vera* anacı üzerindeki çeşitlerde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, erken çıtlamış meyve oranı en fazla *P. khinjuk* (%3.1) anacı üzerine aşılanmış çeşitlerde belirlenmiş, bunu *P. vera* (%1.4) anacı üzerindeki çeşitler takip etmiş, en az erken çıtlama *P. atlantica* (%0.9) anacı üzerindeki meyvelerde saptanmıştır (Atlı ve ark. 2014).

2.1.4.6. Anaçların Geleneksel Çoğaltım Metotları

Günümüzde geleneksel olarak antepfıstığı anaçları tohumları ile çoğaltılmaktadır. *Pistacia* türlerinin tohumlarında çimlenme oranının beklenenden çok düşük düzeyde olduğu ve bu durumun üreticiler için önemli bir problem yarattığı bildirilmiştir (Ayfer ve Serr 1961). Antepfıstığı anaçlarına ait tohumların çimlenme oranının düşük olması, materyal temininde zorluklara neden olduğundan, yapılan araştırmalarda tohumların ekimden önce kabuklarının soyulması, suda bekletme veya gibberellinler gibi çimlenmeyi arttırıcı bazı kimyasal maddelerin kullanılması, çimlenmeyi büyük ölçüde arttıran faktörler olarak belirlemişlerdir (Ayfer ve Serr 1961).

Tohumları ekmeden önce 13-14°C'de 15 gün kadar suda bekletme çimlenme oranını arttırdığını ileri sürülmüştür (Kuru ve ark. 1986). Bunun yanı sıra, tohumları ekmeden önce, tohum kabuğunu çatlatma da, çimlenme oranını arttırdığı gözlenmiştir

(Kuru ve ark. 1986). Benzer şekilde *P. vera, P. khinjuk* ve *P. atlantica* tohumlarının çimlenmesi araştırmalarında, önce 14 gün boyunca oda sıcaklığında suda ardından 7 gün boyunca giberellik asidin 100 ppm lik çözeltisinde bekletme her üç türde de çimlenme oranını artırdığı tespit edilmiştir (Kuru ve Aksu 1995).

Pistacia anaçlarının kontrollü çaprazlanmasıyla elde edilen *P. atlantica X P. integerrima* (UCB-1) melezi olgun ağaçlarının beş tanesi kuvvetli bir şekilde budanmış ve budamadan sonra gelişen genç sürgünler köklendirilmeye çalışılmıştır. Bu sürgünlerin uzunlukları, çelik pozisyonları ve genotiplerinin köklendirmeye etkileri çeşitli IBA konsantrasyonlarıyla (0.40-80 $g1^{-1}$) araştırılmıştır. Genotipin dışında sürgün uzunluğu, çelik pozisyonu, ve IBA konsantrasyonunun köklendirmeye etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Almehdi ve ark. 2002)

Pistacia anaçlarının tohum çimlendirme kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada tohumlara uygulanan skarifikasyon, stratifikasyon ve giberellik asite daldırma uygulamaları, çimlenme oranında artışın olduğunu göstermiştir (Abu- Qaoud 2007). Aynı şekilde *P. vera* tohumları üzerinde yapılan çimlendirme çalışmalarında giberellik asit, benziladenin, giberellik asit ve benziladenin çözeltilerinin çeşitli konsantrasyonları ve bu çözeltide çeşitli sürelerde bekletme tohum çimlenmesini artırdığı bildirilmiştir (Ameen ve Al- Imam 2007).

2.2. Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Teknikleri

Bitki hücre ve doku kültürü konusu, aseptik şartlarda; yapay bir besin ortamı (bir karbon ve enerji kaynağı olan şeker, inorganik tuzlar, mikro ve makro elementler ile çeşitli vitaminleri içeren ve sıvı veya agar ile katılaştırılmış steril bir büyüme ortamı) içinde ya da üzerinde, bitki hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (epidermis, meristem doku), ya da organlarından (yaprak, kök vb.) alınan eksplantların kültürünü içeren oldukça geniş bir alanı kapsamaktadır.

Bitki hücre ve doku kültürleri aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar;

1- Organ Kültürleri

- Kök kültürleri

- Sürgün (apikal) kültürleri

- Anter ve polen kültürleri

2- Doku Kültürleri (Kallus)

3- Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları)

4- Somatik Embriyogenezis

5- Mikroaşılama

Klonal çoğaltım için genellikle meristem yada sürgün kökenli kültürlerin genetik olarak çok daha stabil olduklarına inanılır. Bitki hücrelerinin totipotent özelliği, hücre döngüsü ile hücre büyüme ve gelişmesi üzerine araştırmalarda, istenilen uygun eksplantın ve büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besi ortamının seçilmesine, fiziksel çevre koşullarının kontrol edilebilirliğine imkan vermesi nedeniyle bitki hücre ve doku kültürleri tercih edilmektedir.

Genel anlamda mikroçoğaltma; sürgün ucu ve bunlara ait eksplantlardan bitkilerin *in vitro* klonal çoğaltılması veya genellikle tomurcuklardan gelişen sürgünlerin alt kültürler boyunca çoğaltılması şeklinde tanımlanabilir. Ayrıca meristem dokulardan meydana gelen doğrudan somatik embriyo oluşumuna da mikroçoğaltım denilebilir. Ancak mikroçoğaltımı, sentetik besi ortamlarında, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturma potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre yada polen tanesi vb.) aseptik şartlar altında yeni bitkilerin elde edilmesi şeklinde tanımlayabiliriz (Mansuroğlu ve Gürel 2002). Bu şartlarda kültür, 4-8 hafta sonra da alt kültür yapılabilir. İlk kez Morel (1960) tarafından çalışılan bitki materyallerinin hızlı klonal çoğaltımı için apikal meristem kültürleri kullanılır. Başka bir şekilde bir kallus ya da süspansiyon kültürü yapılabilir ve alt kültürler sonucunda da bitki formuna yükseltilebilir. Bu metot özellikle serbest patojenlerin hızlı artışının olduğu heterozigot ve süs bitkileri üretimi için kullanışlıdır.

Mikroçoğaltımın avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

a. Her türlü hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal ve stokların elde edilmesi,

b. Elde edilen bitkilerde fenotipik ve genotipik homojenitenin sağlanması,
c. Geleneksel yöntemlerden daha kısa kültür süresine sahip olması,
d. Üretilmesi güç olan bitki türlerinin daha kolay üretimine imkan vermesi,
e. Seçkin veya üstün genotiplerin hızlı çoğaltımına olanak sağlanması,
f. Klasik yöntemlere göre üretimde daha az anaç kullanılması,
g. Somaklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin veya genotiplerin elde edilebilmesi,
h. Bazı bitki materyallerinin hızlı bir şekilde elde edilmesini, klonlamada kullanılacak materyalin erken elde edilmesini sonuçlandırması,
i. Verimsiz hibritlerin çoğaltımı için önemlidir. Örneğin meyve bahçelerindeki türlerin yada fıstık gibi son derece değişken heterozigot türlerin klonal çoğaltımı yoluyla tek tip bitki topluluğu elde edilmesi,
j. Yıl boyunca ortaya çıkabilecek mevsimsel zorlukları ortadan kaldırması,
k. İstenilen genotipte bitkilerin çoğaltılmasını mümkün kılması,
l. Tohumdan yetiştirme metotlarından daha hızlı bir şekilde çoğaltım sağlaması,
m. Küçük bir yerde çok miktarda fide/fidan üretimine olanak sağlaması,
n. Alt kültürler arasında özel bir dikkat gerektirmemesi (örn. sulama, zararlı ot mücadelesi vb.),
o. İhtiyaca göre bazı türler için otomatik çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesini mümkün kılması,
p. Rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları için ara devre oluşturması,
q. Transgenik bitkilerin klonlanması için bir araç olması,
r. Sentetik tohum üretimine olanak sağlamasıdır.

2.3. *P. khinjuk* ve Diğer *Pistacia* Türleri ile ilgili Yapılan *in vitro* Mikroçoğaltım Çalışmaları

Pistacia cinsi ile ilgili birçok türde *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan türler genellikle antepfıstığı anacı olarak kullanılan türlerdir.

P. khinjuk, P. atlantica, P. terebintus ve *P. integerrima* anaçlarının tohumları kullanılarak klonal çoğaltımı doku kültürü teknikleri ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir (Çetiner ve ark. 1997).

Olgun *P. vera* ağaçlarından alınan nodal tomurcuklardan aksenik eksplantlar elde edildikten sonra 2 mgl^{-1} benzil adenin (BA) içeren MS (Murashige ve Skoog 1962) besi ortamında sürgünlerin çoğaltılabileceği ve bu sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesinde 4 $mg1^{-1}$ indol bütirik asit (IBA) içeren MS besi ortamının kullanılabileceği rapor edilmiştir. Meydana gelen bitkiciklerin başarılı bir şekilde sera koşullarına aktarıldığı tespit edilmiştir (Onay 2000).

Erkek antepfıstığı (*P vera*) cv. 'Atlı' ağaçlarından alınan apikal tomurcukların yüzey dezenfeksiyonu % 10'luk NaOCl çözeltisinde 40 dakika çalkalanarak başarılmıştır. Sürgünlerin çoğaltılması için farklı sitokinin çeşitleri [(BA, Kinetin Thidiazuran (TDZ)] denenmiş ve en iyi sonucun 0.5-2 mgl^{-1} BA destekli MS besi ortamında olduğu ortaya konmuştur. Aynı araştırıcı sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında 2 mgl^{-1} IBA içeren MS besi ortamının daha uygun olduğunu tespit etmiştir. Köklendirilen bitkiciklerin başarılı bir şekilde aklimatize edildiği rapor edilmiştir (Tilkat 2006).

P. khinjuk, P.terebinthus, P. atlantica, ve *P.mutica* tohumlarında %70 etanolde 5 dakika çalkalamadan sonra 1 defa steril saf suda yıkama işlemine ek olarak %15'lik ticari NaOCl'de 15 dakika çalkalama ve steril saf su ile 1 defa yıkama, son olarak tekrara %70'lik etanolde 2 dakika çalkalanıp 3 defa steril saf su ile yıkanması durumunda başarılı bir dezenfeksiyonun elde edildiği rapor edilmiştir. Bu tohumların 1 g l^{-1} of aktif kömür, 5 mg l^{-1} benzil amino pürün (BAP), 250 mg l^{-1} malt ekstaktı, 250 mg l^{-1} kazein hidrolizat, ve 30 g l^{-1} sukroz destekli MS besi ortamında *P. khinjuk, P.terebinthus, P. atlantica,* ve *P.mutica* sırasıyla %35.2, 20.4, 24.3, 41.6 oranlarında çimlendikleri rapor edilmiştir (Can ve ark. 2006).

P. vera da başarılı somatik embriyo oluşturma protokolleri rapor edilmiştir. (Onay ve ark. 2000,2004a,b) ve cins içerisindeki diğer türlere de bu protokoller kullanılabilmektedir. *İn vitro* da *P. vera, P. atlantica, P. terebinthus* ve *P. lentiscus* tohumlarının çimlendirme protokolleri (Molina ve Trujillo 1999), ayrıca *P. lentiscus'* a

ait tohum ve sürgünlerin *in vivo* ve *in vitro* çoğaltımı tarafından rapor edilmiştir (Yıldırım 2012).

Buttum tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilerek elde edilen aksenik sürgünler eksplant olarak kullanılmış ve sürgün çoğaltımı için BA, *in vitro* köklendirme için IBA kullanılarak elde edilen bitkicikler %95 oranında aklimatize edilmiştir (Tilkat ve ark 2008).

Serada büyütülen genç *P. vera* fidanlarından alınan sürgünler etil alkol, sodyum hipoklorit ve fungisit kullanılarak dezenfekte edilmiştir. Bu sürgünlerin çoğaltılması için MS, DKW (Driver ve Kuniyuki 1984), WPM (Lloyd ve McCown 1980) ve Ruginin ve Verma besi ortamları test edilmiştir. En iyi sürgün çoğaltım ortamının 0.75 mgl^{-1} Naftalen asetik asit (NAA), 0.75 mgl^{-1} indol asetik asit (IAA), 2 mgl^{-1} BA destekli Rugini ve Verma besi ortamı olduğu ortaya çıkmıştır. Köklendirmede in vitro çoğaltılan sürgünlerin basal kısmına 5 mgl^{-1} IBA enjekte edilmiş ve bu sürgünler 1 mgl^{-1} IBA bulunan Rugini ve Verma besi ortamına aktarılarak %73 oranında köklendirilmiştir. Köklendirilmiş bitkicikler başarılı bir şekilde sera koşullarına alıştırılmıştır (Al-Safadi ve Elias 2010).

Erkek *P. vera* ağaçlarından alınan sürgünlerin tomurcukları önce 5-10 dakika akan musluk suyunda bekletildikten sonra %70l'ik etil alkolde 30 saniye çalkalanmış ve ardından %15'lik ticari sodyum hipokloritte 40 dakika çalkalanarak dezenfekte edilmiştir. Bu tomurcuklar 1 mgl^{-1} BA, 30 g sukroz ve 7 g agar destekli MS besi ortamında gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen tomurcukların sürgünleri, 1 mgl^{-1} BA, 0.5 mgl^{-1} $GA_{3,}$ 30 g sukroz, 7 g agar destekli MS besi ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu yeni sürgünler 1 gl^{-1} IBA çözeltisinde 20 dakika bekletilerek 20 g sukroz, 7g agar ile desteklenmiş 1/2 MS ortamında %90 oranında köklenmiştir. Kök apikal meristem hücreleri kullanılarak kromozom sayısı (2n= 30) ve cinsiyet tayini yapılmıştır (Ayaz-Tilkat ve ark. 2011).

Sakız ağacı (*P. lentiscus*) tohumlarından *in vitro* çimlendirilmiş sürgün uçları, MS, DKW,QL (Quoirin ve Lepoivre 1977) ve WPM besi ortamı çeşitlerinde proliferasyona tabii tutulmuş ve en iyi sonucun MS besi ortamında elde edildiği rapor edilmiştir. Sürgün proliferasyonu çalışmalarında 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamının daha yüksek değerlerde yeni sürgünler oluşturduğu ve bu sürgünlerin *in vitro*

köklendirilmesinde 1 mgl^{-1} IBA kullanılmasıyla % 88 oranında köklenme elde edildiği rapor edilmiştir. Steril torfta aklimatize edilen bitkiciklerin dört ay sonunda %96'sı yaşamıştır (Yıldırım 2012).

Tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilen *P. vera*'nın aksenik sürgünleri eksplant olarak kullanılan bu çalışmada *meta*-topolin (*m*T), kinetin ve BA ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda bir sürgün çoğaltım kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sürgünlerin *ex vitro* köklendirilmesinde Rhizopon AA (%2 IBA içeren), ve Rootone F (%0.065 NAA, %0.056 IBA ve % 0.013 2-methyl-1-naphthyl acetamide içeren) karşılaştırılmış ve Rhizopon'un %78.6 oranında daha yüksek bir köklenme oranına sahip olduğu ve bitkiciklerin aklimatizasyonunda %81.5 oranında başarı elde edildiği rapor edilmiştir (Benmahioul ve ark. 2012).

P. atlantica subsp. kurdica türünde tohumdan elde edilen eksplantlar kullanılarak bazı sitokininler [Kinetin, TDZ, BA, 6-BAP (Benzil amino pürin)] ve oksinler (IBA, NAA) ile birlikte denenmiştir. Eksplantların kallus oluşturma kapasiteleri oksin ve sitokininler birlikte kullanıldığında düşümüştür. Sitokinin olarak 1 mgl^{-1} 6-BAP, 30 gl^{-1}, 7 gl^{-1} destekli WPM besi ortamının kullanılmasıyla en yüksek değerin elde edildiği ortaya konmuştur. En düşük kallus oluşturma kapasitesi BA 2 mgl^{-1}, NAA 1 mgl^{-1} 30 gl^{-1}, 7 gl^{-1} destekli WPM besi ortamında ortaya konmuştur (Aghaei ve ark. 2013).

P. atlantica subsp. *Mutica* türünün üç varyetesinden (Taftan, Jan()dagh ve Kabirkoohwere) toplanan olgunlaşmış tohumlar saksıda çimlendirilmiştir. Çimlenen fidelerden alınan apikal ve lateral sürgünler %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika bekletilerek steril edilmiş ve steril edilen apikal ve lateral sürgünler BA ve TDZ içeren MS besi ortamında *in vitro* sürgün çoğaltımı için test edilmiştir. Elde edilen sürgünler *ex vitro* koşullarda Rhizopon'da (%1 IBA içeren) ve 1 gl^{-1} IBA çözeltisinde 1 dakika bekletilerek karşılaştırılmıştır. Kullanılan ekplant tipi ve varyete çeşitlerinde farklılık göstermek üzere 1 gl^{-1} IBA çözeltisinde 1 dakika bekletmenin *ex vitro* köklenme üzerinde daha etkili olduğu ortaya konmuştur (Safari ve ark. 2013).

P. khinjuk, P. vera ''siirt'' *P. vera* ''atlı'' *P. atlantica* türlerin sürgünleri 2 mgl^{-1} IBA içeren sıvı MS besi ortamında geçici daldırma biyoreaktör sistemi (RİTA) kullanılarak *in vitro* koşullarda köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkiler aklimatize

edilmiş ve 4 hafta sonra bitkilerin %90'ı yaşamını sürdürmeye devam etmiştir (Akdemir ve ark. 2014).

2.4. Somaklonal Varyasyon

Somaklonal varyasyon hücre ve doku kültüründeki çeşitlilikler olarak tanımlanır (Larkin ve scowcroft 1981). Somatik hücrelerin *in vitro* rejenerasyonu mitotik bölünme ile gerçekleşmektedir ve bu eşeysiz üremedir. Klonal çoğaltım amacı ile kullanılan *in vitro* teknikler mikroçoğaltım teknikleri olarak da ifade edilmektedir. Amaç aynı genetik yapıda bitkiler üretmektir. Ancak bu tekniklerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlarda ortaya çıkmaktadır. Bu tür varyasyonlar *in vitro* şartlarda doğal olarak meydana gelmektedir ve bunlar ya hücredeki genetik değişimler (genetik varyasyon) ya da hücre ve dokulardaki geçici değişimler (epigenetik varyasyon) olarak ifade edilmektedir (Orbovic ve ark. 2008). Genetik varyasyon, DNA yapısındaki değişiklikler nedeniyle ortaya çıkan kalıtsal varyasyonlardır ve mutasyon olarak kabul edilir (Larkin ve Scowcroft 1981). Epigenetik varyasyon, fizyolojik etkilerden kaynaklanan geçici, kalıtsal olmayan ve geri dönüşümlü değişikliklerdir (Kaeppler ve ark. 2000). Somaklonal varyasyona eksplantın genotipi ve çeşidi (Gaj 2004), kültür süresi (Smýkml ve ark. 2007) ve besi ortamı bileşenleri etki edebilir (Pierik 1987).

Kültüre alınan hücrelerde çok yaygın olarak görülen ve mikroçoğaltımda istenmeyen bu genotipik (genetik) ve fenotipik (epigenetik) varyasyonlar bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Bitki ıslahında doğal varyasyonun daraldığı veya varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda avantajlı olarak değerlendirilen bu varyasyon yeni bir kaynak olarak görülmektedir. Mikro çoğaltım amacı ile yürütülen çalışmalarda varyasyonlar istenmez. Bu nedenle mikroçoğaltımda en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Fakat yinede hangi teknik kullanılırsa kullanılsın mikroçoğaltım boyunca genetik değişimin ortaya çıkma olasılığı her zaman bulunmaktadır (George 1993).

Bitki doku kültürü sonucunda oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesi amacıyla, DNA temelli birçok farklı moleküler belirteç kullanılmaktadır. Genom dizisinde oluşan değişikliklerin belirlenmesi için en çok kullanılan belirteçler;

RAPD, ISSR ve AFLP iken, gen ifadesinde olan varyasyonların tespiti için bi-sülfit dizileme (El- Maarri, 2003) ve MSAP (Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Reyna- Lopez ve ark. 1997) tekniklerinin kullanımı tercih edilmektedir.

Odunsu ve meyve veren bitkilerde, mikroçoğaltım *in vitro* kültürlerin ticari olarak çoğaltımında, büyük bir başarı sağlamaktadır. Bununla birlikte özellikle çok yıllık bitkilerde, mikroçoğaltımla üretilen bitkilerin ana bitkiye benzerliği önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir (Noormohammadi ve ark. 2014). Ancak mikroçoğaltım yöntemleri ana bitki ile klonları arasında somaklonal varyasyon olarak adlandırılan genetik değişikliğin ortaya çıkış durumuna neden olabilir (Larkin ve Scowcroft 1981). *In vitro* olarak çoğaltılan bitkilerde, genetik değişim; çoğaltım yöntemi, genotip, başlangıç materyali olarak kullanılan dokunun doğası, büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve derişimi, altkültür süresi gibi durumlarla karşımıza çıkmaktadır (Pierik 1987). Braun ve ark. (1959), tarafından ilk defa değinilen bu durum araştırma amaçlı ve ticari olarak mikroçoğaltımı yapılan bitki yada bitkiler için önemli bir durum oluşturmaktadır. Bu durumla ilgili olarak, mikroçoğaltımda somaklonal varyasyon birkaç aşamada rapor edilmiştir (morfolojik, sitolojik, sitokimyasal, biyokimyasal ve moleküler) (Noormohammadi ve ark. 2014). Somaklonal varyasyon çalışmalarına daha çok otsu bitkilerde rastlanırken, bu sayı ılıman çok yıllık meyve bitkilerinde azdır (Noormohammadi ve ark. 2014). Somaklonal varyasyon çalışmaları, varyasyonun kontrolü ve mümkünse baskılanması, genetik çeşitlilik üretmek için bir metot olarak kullanılarak genetik gelişimin iyileştirilmesinde önemlidir (Rani ve ark. 1995, Sheidai ve ark. 2012, Noormohammadi ve ark. 2014). Muhtemel somaklonal varyasyonların gelişimin erken dönemlerinde belirlenmesi, bitki doku kültürünün ve transgenik bitki üretiminin kalite kontrolü açısından önemlidir (Rani ve ark. 1995, Sheidai ve ark. 2012, Noormohammadi ve ark. 2014).

Pistacia türlerinde farklı moleküler belirteçler kullanılarak filogenetik sınıflandırmalar ve tür içi genetik farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır (Kafkas ve perl-Treves 2001, Kafkas ve ark. 2002, Al- Saghir 2012, Ghaemmaghami ve ark. 2012). *P. khinjuk, P. vera* ve *P. atlantica* türlerinde cinsiyet tayini, karakterize edilmiş bölge dizisi çoğaltımı (SCAR, Jiang ve Sink 1997) ve RAPD belirteçleri kullanılarak belirlenmiştir (Esfandiyari ve ark. 2011).

İn vitro mikroçoğaltımı yapılan birçok türde somaklonal varyasyon analizi yapılmıştır (Karp 1994). *Pistacia* cinsinin birçok türünde *in vitro* mikroçoğaltım yapılmasına rağmen somaklonal varyasyon analizi ile ilgili çalışmalar *P. vera* (Ozden Tokatlı 2005, Akdemir ve ark. 2013) ve *P. lentiscus* (Kılınç ve ark. 2014) türlerinde henüz yapılmıştır. *P. vera* türünün Atlı ve Siirt kültür tiplerinde *in vitro* çoğaltılan sürgünler kriyoprezervasyon işlemine tabii tutulduktan sonra tekrar *in vitro* çoğaltılarak genetik kararlılığı belirlenmeye çalışılmıştır. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği ile genetik kararlılığı analiz edilen türde, genetik kararlılığın yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Akdemir ve ark. 2013). *P. lentiscus* türünde yapılan klonal mikroçoğaltım ile elde edilen ve 1 yıl süre ile alt kültürü yapılan eksplantlarda IRAP (Retrotranspozon arsı çoğaltılmış polimorfizim) belirteç tekniği kullanılarak genetik stabilite analizi yapılmış ve kabul edilebilir düzeyde bir polimorfizimin olduğu rapor edilmiştir (Kılınç ve ark. 2014).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada kullanılan materyal ve metot iki kısımdan oluşmaktadır.

1. Mikroçoğaltım İle İlgili Materyal ve Metot

2. Somakalonal Varyasyon İle İlgili Materyal ve Metot

3.1. Somaklonal Varyasyonla İlgili Materyal ve Metot

3.1.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada bitki materyali olarak, Gaziantep Fıstık Araştırma İstasyonu'nda bulunan dişi *P. khinjuk* ağaçları (Ağaç 1, Ağaç 2) seçilmiştir. Bu ağaçların apikal ve lateral tomurcukları kullanılmıştır. Apikal sürgün tomurcuğundan itibaren 20 cm uzunluğunda kesilen sürgünler nemli temiz bezlere sarılarak plastik kaplar içinde karanlık bir ortamda laboratuvara getirilerek deney gününe kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

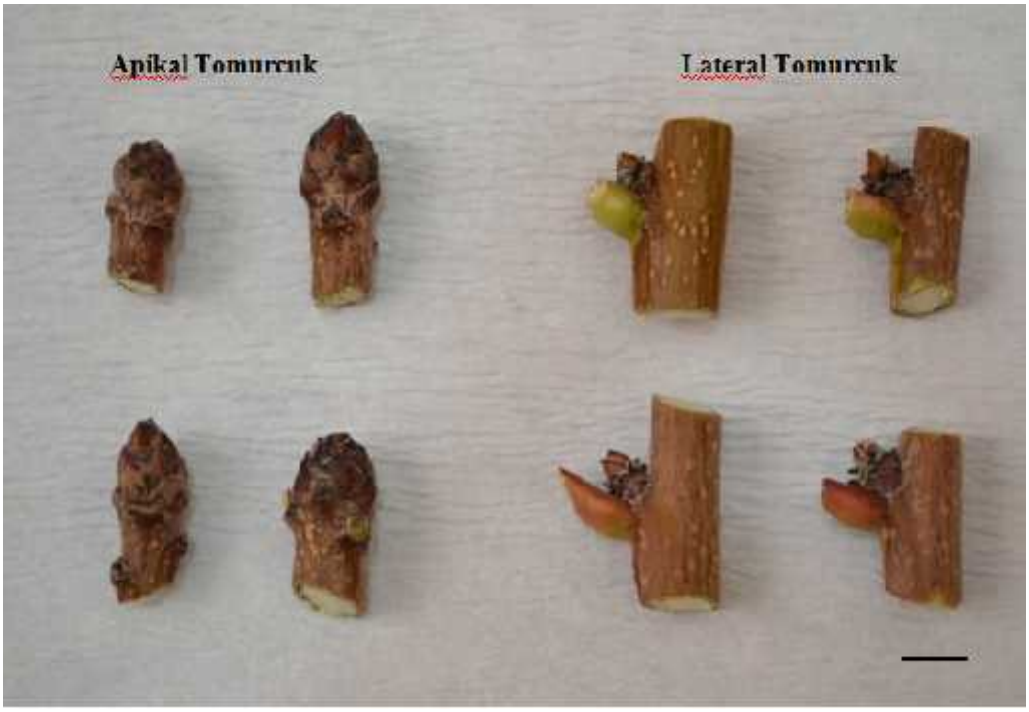
Rejenerasyon için kullanılacak sürgünler, *in vitro* koşullarda steril olarak prolifere edilmiş apikal tomurcuklardan sağlanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri

Çalışmada eksplant olarak dişi buttum ağaçlarının (Ağaç 1, Ağaç 2) apikal ve lateral tomurcukları kullanılmıştır (Şekil 3.1). *In vitro* çalışmalarda kullanılan materyal tiplerini şu şekilde sınıflandırabiliriz:

Apikal Tomurcuk: Yılın tüm dönemlerinde aylık periyotlarla ağaçlardan alınan 1-2 cm uzunluğundaki bitkisel materyaldir.

Nodal Tomurcuk: Vejetasyon dönemi içerisinde gelişen bir yaşındaki sürgünler üzerinde bulunan tomurcuklardır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan eksplant tipleri (apikal ve lateral tomurcuklar Bar: 8.5 mm).

3.2. Metot

3.2.1. Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

3.2.1.1. Besi Ortamının İçeriği

Sürgün proliferasyonuna besi ortam tipinin WPM (Lloyd ve McCown 1980), SH (Schenk ve Hildebrandt 1972*)* ve MS (Murashige ve Skoog 1962) etkisinin test edildiği deney haricindeki bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog (Murashige Skoog, 1962; Standart MS besi ortamı) katı besi ortamı kullanıldı (Çizelge 3.2).

Tüm çalışmalarda besi ortamı 7.0 gl^{-1} agar (Sigma Ltd.) ile desteklendi. Organojenez çalışmaları için kullanılan karbonhidrat miktarları ve bitki düzenleyicilerinin konsantrasyonları ilgili alt bölümlerde ayrıca verilecektir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan besi ortamları ve içerikleri

Bileşenler	MS	WPM	SH
Amonyum nitrat	1650.0	400.0	-
Borik asit	6.20	6.20	5.0
Kalsiyum klorit (susuz)	332.20	72.50	200
Kalsiyum nitrat	-	386.0	-
Kobalt klorit hekzahidrat	0.0250	-	0.1
Bakır sülfat pentahidrat	0.0250	0.250	0.2

Disodyum EDTA dehidrat	37.260	37.30	20
Demir sülfat heptahidrat	27.80	27.80	15
Magnezyum sülfat (susuz)	180.70	180.70	400
Manganez sülfat	-	22.30	-
Manganez sülfat monohidrat	16.90	-	10
Myo-İnositol	100.0	-	1000
Nikotinik asit	1.0	-	50
Potasyum iyodit	0.830	-	1.0
Potasyum nitrat	1900.0	-	2500
Potasyum fosfat monobazik	170.0	170.0	-
Potasyum sülfat	-	990.0	-
Piridoksin hidroklorit	1.0	-	0.5
Sodyum molibdat dehidrat	0.250	0.250	300
Tiamin hidroklorit	10.0	-	5.0
Çinko sülfat heptahidrat	8.60	8.60	1.0

3.2.1.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Dezenfeksiyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılan besi yerleri; WPM, SH ve MS Besi ortamı içerikleri (Çizelge 3.1)

Besi ortamı stok çözeltilerinin hazırlanması

MS (makro elementler) ana çözeltisi

NH_4NO_3	1650 mg
KNO_3	1900 mg
$CaCl_2.2H_2O$	440 mg
$MgSO_4.7H_2O$	370 mg
KH_2PO_4	170 mg
Distile Su	1000 cc'ye tamamlanır.

MS mikro elementler 1 ana çözeltisi

H_3BO_3	6.2 mg
$MnSO_4.4H_2O$	22.3 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6 mg
KI	0.83 mg
$Na_2MoO_42H_2O$	0.35 mg
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

MS mikro elementler 2 ana çözeltisi

$CuSO_4.5H_2O$	0.025 mg

$CoCl_2.6\ H_2O$	0.025 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

MS Kompleks kelatör ana çözeltisi

$FeSO_4.7H2O$	5570 mg
Na_2EDTA	7450 mg
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

MS Vitamin karışımı ana çözeltisi

Nikotinik asit	0.5 mg
Glisin	2 mg
Pridoksin HCl	0.5 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

MS B_1 vitamini ana çözeltisi (10^{-3})

Tiamin HCl	100 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

MS *myo* – inositol

myo – inositol	5000 mg
Distile su	500 cc'ye tamamlanır

Çizelge 3.2. Standart Murashige ve Skoog (MS) İçeriği (gl^{-1})

Agar	7 g
Sukroz	30 g
MS ana çözeltisi (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc
Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
Myo - inositol	10 cc
B_1 vitamini ana çözeltisi	1 cc
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

SH ana solüsyon

$NH_4H_2PO_4$	750 mg
KNO_3	6250 mg

$CaCl_2.2H_2O$	500 mg
$MgSO_4.7H_2O$	1000 mg
Distile su	250 cc ye tamamlanır.
SH mikro elementler 1 ana çözeltisi	
H_3BO_3	50 mg
$MnSO_4.4H_2O$	100 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	10 mg
KI	10mg
Distile su	100 cc ye tamamlanır.
SH mikro elementler 2 ana çözeltisi	
$CuSO_4 .5H_2O$	20 mg
$CoCl_2.6\ H_2O$	10 mg
$Na_2MoO_4 2H_2O$	10 mg
Distile su	100 cc ye tamamlanır.
SH Kompleks kelatör ana çözeltisi	
$FeSO_4.7H2O$	750 mg
Na_2EDTA	1000 mg
Distile su	500 cc ye tamamlanır.
SH Vitamin karışımı ana çözeltisi	
Nikotinik asit	500 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Tiamin HCl	500 mg
Distile su	100 cc ye tamamlanır.
SH *myo* – inositol	
myo – inositol	10000 mg
Distile su	500 cc ye tamamlanır.

Çizelge 3.3. Standart Schenk ve Hildebrandt (SH) İçeriği (gl^{-1})

Agar	7 g
Sukroz	30 g
MS ana çözeltisi (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc

Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
Myo - inositol	10 cc
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

WPM ana çözeltisi

NH_4NO_3	2000 mg
$CaCl_2.2H_2O$	480 mg
$MgSO_4.7H_2O$	1850 mg
KH_2PO_4	850 mg
$CaNO_3$	2775 mg
Distile Su	500 cc'ye tamamlanır**.**

WPM Mikro elementler I ve II çözeltisi

H_3BO_3	310 mg
$MnSO_4.4H_2O$	1115 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	430 mg
$CuSO_4 .5H_2O$	13 mg
$Na_2MoO_42H_2O$	13 mg
Distile su	500 cc'ye tamamlanır.

WPM Kompleks kelatör ana çözeltisi

Na_2EDTA	1865 mg
Distile su	500 cc'ye tamamlanır.

WPM Vitamin karışımı ana çözeltisi

Nikotinik asit	100 mg
Pridoksin HCl	100 mg
Tiamin HCl	1000 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

WPM *myo* – inositol

myo – inositol	5000 mg
Distile su	500 cc'ye tamamlanır.

Çizelge 3.4.. Standart Woody Plant Medium (WPM) İçeriği (gl^{-1})

Agar	7 g
Sukroz	30 g
MS ana çözeltisi (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-I ve II	10 cc
Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
Myo - inositol	10 cc
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

3.2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyici Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

BA (6-Benzilaminopurin) ana çözeltisi (10^{-2})

BA	100 mg
1N NaOH	2-3 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Kinetin ana çözeltisi (10^{-2})

Kinetin	100 mg
1N NaOH	2-3 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

2iP, N^6-(2-Izopentil) adenin ana çözeltisi (10^{-2})

2iP	100 mg
%95 etanol	100 cc'ye tamamlanır.

TDZ (Thidiazuron) ana çözeltisi (10^{-2})

TDZ	22.02 mg
1N NaOH	2-3 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır**.**

NAA (α Naftalenasetik asit) ana çözeltisi (10^{-2})

NAA	100 mg
% 95 etanol	3-5 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

IAA (İndol asetik asit) ana çözeltisi (10^{-2})

IAA	100 mg

% 95 etanol	5-10 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.
IBA (3-Indolbutirik asit) ana çözeltisi (10^{-2})	
IBA	100 mg
% 95 etanol	3-5 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.
2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetik asit) ana çözeltisi (10^{-2})	
2,4-D	100 mg
% 95 etanol	3-5 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Çalışmalarda kullanılan tüm maddeler mgl^{-1} ve/veya (w/v) yüzde ile ifade edildi. Bir litre standart MS besi ortamı hazırlamak için 1 litrelik bir erlenmayer içerisine 250 ml distile saf su bırakıldı. Daha sonra belirtilen konsantrasyonda sukroz eklendi. Bu işlemi sırasıyla; (Çizelge 3.2) verilen MS ana çözeltisi (100 cc), MS mikroelementler-1 (10 cc), MS mikroelementler-2 (1 cc), Komplex kelatör (10 cc), Vitamin karışımı (1 cc.) ve B_1 vitamini ana çözeltisi (1 cc) elemanlarının belirtilen konsantrasyonlarda erlenmayer içine aktarılması izledi. Maddelerin sırasıyla eklenmesinden hemen sonra çökelmeyi önlemek amacıyla hazırlanan çözelti birkaç dakika çalkalandı. Ortam için gerekli olan bu elemanların eklenmesinden sonra, tüm bu karışım distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Daha sonra besi yerleri 250 ya da 500 ml'lik erlenlere aktarıldı. Bitki büyüme maddeleri (oksinler ve sitokininler) eklendikten sonra pH, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile, 5.7 ya da 5.8'e ayarlandı. Ortamın katılaştırılması için 7 g agar eklendi ve bu karışım yine ortamın miktarına bağlı olarak 20 ya da 30 dakika, 121 ºC'de 15 PSI (Pounds Per Square Inch) veya 1,03 bar basınç altında otoklavda eritildi. Eritildikten sonra agarlı besi ortamı Magenta GA 7 kaplarına aktarıldı ve besi ortamı soğuduktan sonra eksplantlar kültüre alındı. Kapakları parafilmle sarılan kültür kapları daha sonra bölüm 3.2.3.1.'de kültür koşulları verilen büyüme odasına yerleştirildi.

3.2.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyici Çözeltisi Hazırlanma

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) stok çözeltilerinin hazırlanması için, büyüme maddelerinin gerekli olan miktarları bir parça alüminyum folyo içinde tartıldı.

Stok çözeltilerin tümü genellikle mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Büyüme maddeleri tartımdan sonra 50 veya 100 ml temiz balon jojeler içerisine, küçük bir magnetik karıştırıcı ile birlikte aktarıldı. TDZ, Kinetin, BA, IAA, IBA, 3-5 ml NaOH ile çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. 2iP, 2,4-D, NAA 5-10 ml %95'lik etanolde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Büyüme düzenleyicilerin hazırlanan stok çözeltilerden Kinetin -20°C'de, TDZ, BA, IAA, IBA, 2iP, 2,4-D ve NAA +4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.2.2. Dezenfeksiyon Teknikleri

Bütün bitki hücre, doku ve organlarında olduğu gibi çalışmada kullanılan dişi buttum ağacı tomurcuklarında mantar ve bakteri kökenli enfeksiyonları engellemek ve kontaminasyonlardan kaçınmak için önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi, mikroçoğaltım işlemlerinde kullanılacak besi ortamı, kullanılan aletler ve kültür kaplarının da tamamen steril şartlar altında kullanılması son derece önemlidir.

Bu sebeple olgun dişi buttum ağacı tomurcukları için, en iyi yüzey dezenfeksiyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir. Bununla birlikte, bu teknik tüm bu mikroorganizmaları uzaklaştıracak, bitki sistemine zarar vermeyecek ve yukarıdaki yöntemlere uygun bir teknik olmalıdır.

Araştırmada gerçekleştirilen bütün *in vitro* çalışmalar esnasında izlenen dezenfeksiyon yöntemleri aşağıda tanımlanmıştır.

3.2.2.1. Isı ile Dezenfeksiyon

Aşağıdaki maddelerde belirtilen materyaller iki katlı alüminyum folyo içine sarıldı ve otoklavda 121°C'de 30 dakika 15 PSI ısı basıncı altında dezenfekte edildi.

1. Besi ortamı içeren erlenmayerler
2. Magenta GA-7 doku kültür kapları

3.2.2.2. Kullanılan Aseptik Yöntemler

Çalışmada gerçekleştirilen tüm işlemler standart dezenfeksiyon yöntemleri izlenerek steril bir oda içindeki steril bir kabin içinde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce tek kullanımlık steril cerrahi Triflex eldivenleri giyildi. İşlem sırasında

düzenli olarak, ayrıca istemeden steril olmayan maddelere dokunulduktan sonra eller %70'lik alkol ile dezenfekte edildi.

Uzun süreli çalışmaların tümünde yüz maskesi kullanıldı. Çalışma yüzeyi her defasında kullanımdan önce %70'lik alkol silindi ve 20 dakika UV ışık altında bırakıldı. Bistüri uçları ve pensler kullanılmadan önce her defasında daima %70'lik alkole ve daha sonra ateşe tabi tutuldu ve steril saf suda soğutuldu.

3.2.2.3. Dezenfeksyonun Korunumu

Dezenfeksiyonun sürdürülmesi için mümkün olan tüm önlemler alındı. İşlem bittiğinde otoklavda dezenfekte edilen maddeler steril odaya hızlı bir şekilde aktarıldı. Bu maddeler yerleştirilmeden önce tezgah yüzeyi ve erlenler %70'lik etil alkol ile silindi.

3.2.2.4. Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Dezenfeksiyonu

Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bisturilerin muhafazası ve üzerinde bitki parçalarının kesilmesi amacı ile iki ayrı ebatta kullanılan filtre kağıtları, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile dezenfekte edildi.

3.2.2.5. Cam Malzemelerin Dezenfeksiyonu

Cam malzemeler (tüp, petri kutusu, erlen, mezür, balonjoje, pipet, beher) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile iyice temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde iki saat bekletilmek suretiyle kurutuldu.

3.2.2.6. Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Dezenfeksiyonu

Pens ve bistüriler, önce %70'lik etil alkol ile silinip 10'arlı guruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 300°C'lik bir kuru sterilizatörde 30 dakika süre ile dezenfekte edildi.

3.2.3. Kültür Şartları

Tüm organojenez çalışmalarında eksplantlar için 50 ml katı besi ortamı içeren Magenta GA7 kültür kapları kullanıldı.

3.2.3.1. Büyüme Odası Koşulları

Kültürler bilgisayar kontrollü 25 °C sıcaklık, 16/8 h fotoperiyot ve 3500 lüx ışık şiddeti uygulanan bitki büyüme odası koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.3. Genel değerlendirme

Bu bölümde genel olarak yöntemler tanımlanmış ve tekrarı önlemek amacıyla çalışmalar ana başlıklar halinde verilerek çalışmayla ilgili metotlar kısaca verilmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm araştırmalar 6 ana başlık altında yürütülmüş olup, bunları şöyle sıralamak mümkündür;

a) Dezenfeksiyon tekniklerinin geliştirilmesi çalışmaları,

b) Kültür başlatma çalışmaları,

c) Sürgün proliferasyon çalışmaları,

d) Köklendirme çalışmaları,

e) Aklimatizasyon ve bahçe şartlarına aktarım çalışmaları

f) Somaklonal varyasyon çalışmaları

3.3.1. Dezenfeksiyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Araştırma kapsamındaki dezenfeksiyon çalışmalarında kullanılan ticari (ACE) sodyum hipokloritin (NaOCl) aktif klor oranı yaklaşık olarak %5 civarında olduğu Türk Standartlar Enstitüsü (TSE) kayıtlarından tespit edilmiştir. Aktif klor oranı belli ACE sterilant olarak kullanılmıştır. Tüm dezenfeksiyon işlemleri steril odada yapılmış olup, çalışmalarda Magenta GA 7 kültür kapları kullanılmıştır. Standart MS besi ortamına 30 gl^{-1} sukroz ve 7 gl^{-1} agar ilave edilerek BBD'siz olarak hazırlanmıştır. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.3.1'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Tüm dezenfeksiyon çalışmalarında yapılan gözlemler ve alınan ölçümler aşağıda belirtilmiştir;

Enfekte Olan Kültür (%); kültürlerin gelişmeleri dikkate alınarak 14 günlük kültür sonunda, enfekte olan kültür sayısının tüm kültürlere oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

Canlı Kalan Eksplant (%); kültürün 28. gününe kadar enfekte olmadan gelişen kültür sayısının, tüm kültürlere oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

Kahverengileşme (%); kültürün 14. gününe kadar herhangi bir gelişme olmayıp, kahverengileşerek bozulan kültür sayısının tüm kültür sayısına oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

Dezenfeksiyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.1.1. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Dezenfeksiyon Metodunun Gelişimi

Bu bölümde dişi buttum ağaçlarından yapılan meristem kültüründen aksenik doku kültürü materyali elde etme süreciyle ilgili sterilant olarak kullanılan NaOCl'in etkisini araştırmak için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

Aşağıdaki bütün deneylerde yüzey dezenfeksiyonu 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcıda, yıkama işlemleri ise elle yapılmıştır.

3.3.1.2. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl Etkisi

Bu deneyde olgun dişi buttum ağaçlarından alınan apikal ve lateral tomurcuklarından aksenik kültür başlatılmasına ve dekontaminasyonuna etkisini tespit etmek için, NaOCl'in %5, %10, %15, %20'lik konsantrasyonları bir kontrol gurubu ile birlikte test edildi.

15-20 mm uzunluğundaki apikal ve lateral sürgünler, 30 dakika NaOCl'in (v/v) %5, %10, %15 ve %20'lik çözeltileri içerisinde bir çalkalayıcı üzerinde 150 rpm'de çalkalandı. Sterilanttan çıkarılan eksplantlar 10'ar dakika 6 defa steril saf su ile iyice yıkandı. Yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulan eksplantların yüzeylerindeki fazla suyun uzaklaştırılması için üzerleri kurutma kağıtları ile kapatıldı.

Steril kurutma kağıdı üzerinde 5-10 dakika bekletilen apikal ve lateral uçlar kültür başlatılması için 1 mgl^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alındı.

3.3.1.3. Eksplantların Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'de Optimum Bekletme Süresinin Tespiti

Önceki deneyde dişi buttum ağacı sürgün uçlarının yüzey dezenfeksiyonu için en iyi konsantrasyonun %10'luk NaOCl olduğu tespit edildi. Bu deney %10'luk

NaOCl'in optimum çalkalama süresini tespit etmek için, eksplantlar 5, 10, 20 ve 40 dakikalık sürelerde test edildi.

3.3.2. Kültür Başlatılması Çalışmaları

Proliferasyon çalışmalarında eksplant olarak kullanılmak amacıyla gerçekleştirilen kültür başlatma çalışmalarında, dişi buttum ağaçlarının (Ağaç 1, Ağaç 2) apikal ve lateral tomurcukları eksplant olarak kullanıldı. Fenolik madde salınımı engellenen ve dezenfeksiyonu sağlanan materyaller standart MS besi ortamlarında kültüre alındı. Magenta GA-7 kültür kaplarına 40-50 ml besi ortamı bırakıldı. Her kültür kabına apikal ve lateral tomurcuk deneyleri için 5'er tomurcuk ekimi yapıldı. Ekim yapılan kültür kapları bölüm 3.2.3.1'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Kültür başlatma çalışmaları süresince yapılan deneylerde her uygulama için 80 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür dönemi sonucunda aşağıdaki ölçümler yapıldı.

Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm); apikal veya lateral tomurcuklardan elde edilen ve altkültüre alınabilecek özellikteki sürgünlerin uzunluklarının ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama Sürgün Sayısı (mm); apikal veya lateral tomurcuklardan elde edilen ve altkültüre alınabilecek özellikteki sürgünlerin sayılarının ortalamasını ifade etmektedir.

Yaşayan Eksplant Yüzdesi; Apikal yada lateral tomurcukların besi ortamına ekimi yapıldıktan sonra kültür dönemi sonunda canlı kalan eksplantların, ekimi yapılan tüm eksplant sayısına oranı (%) olarak ifade etmektedir.

Kültür başlatma çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi

Bu deneyde meristematik apikal ya da lateral uçlar (15-20 mm) sürgün proliferasyonu için kullanıldı. Yüzey strilizasyonu için NaOCI'in %10 konsantrasyonuna 30 dakika tabi tutulan eksplantlar, 10-15 dakika yatay hava akışlı kabinde bekletildikten sonra 1 mgl^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında inkübe edildi.

3.3.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin Etkisi

Önceki deneyde apikal uçlarda daha iyi sonuçlar veren olgun dişi buttum ağacı tomurcukları sitokininlerin (BA, 2iP, TDZ, Kinetin) 1 mgl^{-1} miktarı kontrol gurubu ile birlikte standart MS besi ortamında kültüre alınarak test edildi.

3.3.2.3. Kültür Başlatılmasına BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde olgun dişi buttum ağacı apikal tomurcukları BA'ın 0,5, 1, 2, 4 ve 8 ve mgl^{-1} konsantrasyonundaki etkileri kontrol gurubu ile birlikte test edildi. Eksplantların standart MS besi ortamında 4 haftalık kültüre alınarak ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri rapor edildi.

3.3.2.4. En İyi Rejenerasyon Zamanının Tespiti

Bu deneyde olgun dişi buttum ağaçları için yıl içinde en iyi rejenere zamanını belirlemek amacıyla aylık periyotlarla apikal uçlardan kültür başlatılma çalışmaları yapılmıştır.

3.3.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

Sürgün proliferasyon çalışmalarında gerçekleştirilen deneylerde, materyal olarak apikal tomurcuklardan elde edilen sürgün uçları kullanılmıştır.

Proliferasyon çalışmalarında kullanılacak materyallerin bulundukları kültür kapları steril laminar flow kabin içine alınmadan önce %70'lik etil alkol ile silinerek olası kontaminasyonların önüne geçildi. 1-1.5 cm boyundaki sürgün uçları ekime uygun şekilde temizlenip hazırlanarak 40-50 ml besi ortamı içeren Magenta GA-7 kültür kaplarına konuldu. Ekim işlemleri her kültür kabı 5 adet sürgün içerecek şekilde gerçekleştirildi. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.3.1. 'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Deneylerdeki her uygulama için en az 20 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır.

Ortalama sürgün sayısı; bir eksplant üzerinde gelişen sürgünlerin steril kabin içerisinde sayılarak ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir.

Ortalama sürgün uzunluğu (mm); proliferasyon sonucu gelişen sürgünlerin steril kabin içerisinde dijital kumpas yardımıyla ölçülerek ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir.

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi; kallus oluşturan sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Prolifere olan eksplant yüzdesi; prolifere olan sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi

Olgun dişi buttum ağacı apikal tomurcuklarından elde edilen sürgünlerin proliferasyonuna besi ortamı tipinin (MS, SH, WPM) etkisinin araştırıldığı bu çalışmada farklı besi ortamlarına bırakılan sürgünler 1 $mg1^{-1}$ BA ile desteklendi. Dört haftalık kültür dönemi sonunda test edilen parametreler rapor edildi.

3.3.3.2. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortamnın Farklı Kuvvetlerinin Etkisi

Sürgün proliferasyonuna MS besi ortamının 1/4, 1/2, 1/1, 2/1 konsantrasyonları araştırıldı. Besi ortamı 1 $mg1^{-1}$ BA ile desteklendi. Dört haftalık kültür dönemi sonunda test edilen parametreler rapor edildi.

3.3.3.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi

Sürgün proliferasyonuna farklı sitokinin (BA, 2iP, TDZ, Kinetin) tiplerinin etkisinin araştırıldığı bu deneyde eksplant olarak apikal sürgün uçları kullanıldı. Apikal sürgün uçları her biri 1 mgl^{-1} sitokinin içeren standart MS besi ortamında kültüre alınarak gerekli olan en iyi sitokinin çeşidinin tespiti çalışmaları yapıldı.

3.3.3.4. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde önceki deneyde iyi sonuç veren sitokinin (BA) 0.25 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 mgl^{-1} konsantrasyonda besi ortamına ilavesi, kontrol gurubu ile birlikte test edildi.

3.3.3.5. Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin Oksin Kombinasyonunun Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyonunda daha önceki deneylerle optimize edilen proliferasyon koşullarının iyileştirilmesi için, 2 mgl^{-1} BA içeren standart MS besi ortamına oksin ilavesinin (IAA, NAA ve IBA; her biri 0.1-0,3 mgl^{-1}) etkileri araştırıldı. Dört haftalık kültür dönemi sonucunda test edilen parametreler istatistiksel işlemlere tabi tutulmuş ve elde edilen veriler rapor edilmiştir.

3.3.3.6. Sürgün Proliferasyonuna Karbonhidrat Tipinin Etkisi

Apikal sürgünlerden itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine sukroz, glikoz, fruktoz ve maltozun etkileri kontrol gurubu ile birlikte araştırıldı. Standart MS besi ortamında kültüre alınan her gurup için dört haftalık kültür dönemi sonunda ölçülen parametreler rapor edildi.

3.3.3.7. Sürgün Proliferasyonuna Sukrozun Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Önceki deneyde apikal sürgünlerden sürgün çoğaltılması çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen sukrozun farklı konsantrasyonları (%1-10) kontrol gurubu ile test edilmiştir. Dört haftalık kültür dönemi sonunda ölçülen parametreler rapor edilmiştir.

3.3.4. Sürgünleri Köklendirme Çalışmaları

20 yaşındaki dişi buttum ağaçlarından *in vitro* elde edilen aksenik sürgünlerin apikal tomurcuklarından elde edilen yeni sürgünler *in vitro* koşullarda çoğaltılarak *in vitro* köklendirme deneylerinde, materyal olarak kullanıldı.

Köklendirme çalışmalarında kullanılacak materyallerin bulundukları kültür kapları steril laminar flow kabin içine alınmadan önce %70'lik etanol ile silinerek olası kontaminasyonların önüne geçildi. Deneylerde amaca uygun olarak alınan sürgünler ekime uygun şekilde temizlenip hazırlanarak 40-50 ml besi ortamı içeren Magenta GA-7 kültür kaplarına konuldu. Ekim işlemleri her kültür kabı 4 adet sürgün içerecek şekilde gerçekleştirildi. Ekim yapılan kültür kapları bitki büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Deneylerde kullanılan apikal sürgünler 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamıdan alınıp deneysel çalışmalarda kullanıldı. Her uygulama için 20 eksplant kullanılarak bölüm 3.2.3.1'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Köklenme Oranı (%); köklenen sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Eksplant Başına Düşen Kök Sayısı; köklenen her bir sürgündeki primer kök sayısının ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama Kök Uzunluğu (mm); köklenen sürgünlerdeki primer kök uzunluğunun dijital kumpasla ölçülerek ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir.

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi; kallus oluşturan sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Prolifere olan eksplant yüzdesi; prolifere olan sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Sürgünlerin köklendirilmesi çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.4.1. Sürgünlerin Köklenmesine Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

Bu bölümde, *in vitro* şartlarda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 20–30 mm uzunluğundaki köklenmeye elverişli olan sürgünlerin köklenmelerine dört farklı oksininin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D; her biri 1 mgl^{-1}) etkileri araştırıldı. Dört haftalık kültür döneni sonunda test edilen parametreler rapor edildi.

3.3.4.2. Sürgünlerin Köklenmesine NAA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde *in vitro* şartlarda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesine en iyi cevap veren oksin tipinin (NAA) 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 mgl^{-1} konsantrasyonlarının etkileri araştırıldı.

3.3.4.3. Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* şartlarda çoğaltılan sürgünlerin uzunluğunun *in vitro* köklenmeye etkisi araştırıldı. Bu amaçla: 1, 2, 3 ve 4 cm uzunluğundaki sürgünler en iyi köklenmeyi sağlayan oksin konsantrasyonu içeren besi ortamında kültüre alındı.

3.3.5. Aklimatizasyon Çalışmaları

İn vitro koşullarda köklenmiş dişi buttum ağacı bitkiciklerinin arazi şartlarına alıştırılmasında ilk aşama olan aklimatizasyon (şaşırtma) için ticari torf (tam dezenfekte edilmiş, yarı dezenfekte edilmiş ve dezenfekte edilmemiş) kullanılmıştır. Bitkicikler *in vitro* köklenme ortamından çıkarılıp musluk suyu altında yıkanarak, su içerisinde bir süre bekletildikten sonra tam dezenfekte edilmiş, yarı dezenfekte edilmiş ve dezenfekte edilmemiş ticari torf içeren plastik saksılara dikilmişlerdir. Dikim işleminden sonra can suyu verilen bitkilerin üzerleri cam beherlerle kapatılarak Bölüm 3.2.3.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sulama işlemi düzenli olarak yapılmak ve ekimi yapılan bitkilerin üzeri 7. günden itibaren aşamalı olarak (7. günde 10 dakika, 8. günde 20 dakika, 9. günde 1 saat, 10. günde 2 saat, 11. günde 4 saat) açılmak suretiyle ortamın nemi kontrol altında tutulmuştur. Bu şekilde gelişmeye bırakılan bitkilerin üzeri bir haftalık bir süre sonunda tamamen açılmıştır. Üzeri tamamen açılan bitkiler 2-3 hafta büyüme odasında bekletildi. Son olarak torf ve toprak karışımı içeren saksılara aktarılıp arazi koşullarına aktarılmaya hazır hale getirildi.

3.3.5.1. Aklimatizasyon Çalışmalarına Torfun Etkisi

Aklimatizasyon çalışmalarında kullanılan torf 3 şekilde sınıflandırılmış ve şöyle hazırlanmıştır;

a. Dezenfekte Edilmiş Torf; 2.5 litrelik torf, 2 kat alüminyum folyoya sarılarak otoklavda 1 atmosfer basınçta 121 ºC'de 25 dakika süre ile dezenfekte edilmiş materyali ifade etmektedir.

b. Yarı Dezenfekte Edilmiş Torf; otoklavda 1 atmosfer basınçta 121 ºC'de 25 dakika süre ile dezenfekte edilmiş torf ile dezenfekte edilmemiş torfun 1:1 oranında karışımından oluşan materyali ifade etmektedir.

c. Dezenfekte Edilmemiş Torf; dezenfekte edilmeden kullanılan materyali ifade etmektedir.

3.4. İstatistiksel Analiz ve Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri **SPSS 15.0** paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA'ya tabi tutulmuştur. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ seviyesinde *Duncan* çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Oransal veriler durumunda ise Ki kare (χ^2) testi uygulanmıştır.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

$P > 0.05$ = önemli değil

$P < 0.05$ = önemli

$P < 0.01$ = çok önemli

$P < 0.001$ = oldukça çok önemli

3.5.. Somaklonal Varyasyon İle İlgili Materyal ve Metot

3.6. Bitkisel materyal

İn vitro mikroçoğaltımda kültür başlatma için iki adet seçkin buttum ağacı (Ağaç 1, Ağaç 2) sürgünleri kullanıldı. Bu ağaçlardan biri ağaç 1 diğeri ağaç 2 olarak adlandırıldı. Ağaç 1 ve ağaç 2 den *in vitro* çoğaltılan sürgünlerin 5.,10., 15., 20., 24. alt kültürlerinden elde edilen klonların yaprak örnekleri alınarak aluminyum folyoya sarıldı ve -20 ^{o}C de saklandı.

Ana materyal (Ağaç 1, Ağaç 2) ve klonlara ait yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu, Kafkas ve ark (2001) DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi.

3.7. Metod

3.7.1. Genomik DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu için antepfıstığında uygulanmakta olan Doyle ve Doyle (1987)'nin geliştirdiği ve Kafkas ve ark. (2001) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır.

Dondurulmuş yaprak örneklerinden 2 g tartılarak -20 ^{o}C soğutulmuş havan içine kondu. Sıvı azotla beraber 0.36 g PVP (polyvinylpyrrolidone) ve 0.009 g $Na_2S_2O_5$ ile

havanda öğütülerek toz haline getirildi. Taze hazırlanmış ve ısıtılmış (65°C) 9 m1 DNA ekstraksiyon tomponu [CTAB tamponu 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), β-mercapto-ethanol içerir] havana eklendi. Toz hızlı bir şekilde 50 ml falkon tüpe kondu. Tüp 60 dakika 65°C lik su banyosunda inkübe edildi bir saatlik süre boyunca 5-10 dakikada bir tüp hafifçe çalkalandı. Daha sonra tüp 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. DNA ekstraksiyon tampon çözeltisi ile eşit miktarda (9 ml) kloroform:izoamil alkol (24:1) ilave edildi. Tüp oda koşullarında çalkalayıcı yardımıyla 15-20 dakika boyunca hafifçe çalkalandı. İçinde yaprak örneği ve CTAB, kloroform:izoamilalkol bulunan tüp daha sonra, 5000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sulu faz pipetle alınarak 15 ml'lik yeni tüpe aktarıldı. Bu tüpe tekrar 9 ml kloroform:izoamil alkol (24:1) ilave edildi ve 5000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst sulu faz alınarak yeni tüpe aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan miktarın 2/3'ü ya da aynı miktarı kadar dondurulmuş (-20°C) izopropanol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Sonra -20°C'lik dondurucuda bir gece bekletildi. Sonraki gün ve 1500 devir/dakika'da 2 dakika santrifüj edildi ve DNA çökeltisinie zarar vermeden üst faz uzaklaştırıldı. İçerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan %76'lık etil alkolden 3 ml ilave edilerek 2 saat su banyosunda çalkalnarak genomik DNA'nın yıkanması sağlandı. Yıkamadan sonra 1500 devir/dakika'da 2 dakika santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı. DNA'lar 37°C'lik inkübatörde 1-2 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulan genomik DNA'yı tüpte tekrar süspansiyon haline getirmek için 100 µl steril susuz DNaz kullanıldı. RNA'yı uzaklaştırmak için 1.5µl RNaz (10 µg/ml) eklendi ve 37°C 30 dakika inkübe edildi. Genomik DNA'lar -20°C'de uzun süre +4°C'de kısa süreliğine saklandı. Kurutulan genomik DNA'lar ultra saf suda çözdürülüp DNA miktarı Qubit®2.0 florometre (Invitrogen) cihazı ve kiti kullanılarak saptandı.

Çizelge 3.5. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler

Kimyasallar	Bileşenlerler	Hazırlık
Eksteaksyon tamponu	Tris HCl (H 8.0)(100 mM) Na Cl (1.4 M) EDTA (20 mM) CTAB (2%) β-merkapto-etanol (2%)	Tüm bileşenler 60°C karıştırılır ve 0.2%'lik ß-merkaptoetanol kullanımdan hemen önce eklenir
Kloroform: izoamil alkol	Kloroform: izoamil alkol	Kloroform: izoamil alkol 24:1 oranında karıştırılır
İzopropanol	İzopropanol (100%)	Saf isopropanol küçük bir şişede dondurucuya konur (-20℃).
Yıkama tamponu	Amonyum asetat (10 mM) Etanol (76%)	Amonyum asetat (10 mM) Etanol (76%) ile karıştırılır ve +4℃ konur
RNaz	RNaz (10 mg/ml)	Kullanım için hazırdır.

Çalışmada ana mataryeller ve klonlara ait genomik DNA' ların taranmasında 20 ISSR primeri kullanıldı (çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

No	Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')	Primer Bağlanma Sıcaklğı
1	3ASSR27	$(CT)_7GAG$	51 ^{0}C
2	3ASSR53	$(AG)_8CA$	51 ^{0}C
3	CHR	$(CA)_7YG$	51 ^{0}C
4	UBC 830	$(TG)_8G$	51 ^{0}C
5	UBC 847	$(CA)_8RC$	51 ^{0}C

6	UBC 859	$(TG)_8RC$	51 ^{0}C
7	ISSR 15	$(CA)_8RC$	53 ^{0}C
8	ISSR 8	$(GA)_8YG$	53 ^{0}C
9	UBC 811	$(GA)_8C$	53 ^{0}C
10	UBC 835	$(AG)_8YC$	53 ^{0}C
11	UBC 855	$(AC)_8YT$	53 ^{0}C
12	W 814	$(CT)_8TG$	53 ^{0}C
13	3ASSR42	(GACA)4C	54 ^{0}C
14	3ASSR55	$(AG)_8TG$	54 ^{0}C
15	ISSR 18	$(GT)_8YA$	54 ^{0}C
16	ISSR 4	$(AG)_8RT$	54 ^{0}C
17	ISSR 9	$(GT)_8RA$	54 ^{0}C
18	UBC 825	$(AC)_8T$	54 ^{0}C
19	UBC 841	$(GA)_8YC$	54 ^{0}C
20	UBC 857	$(AC)_8YG$	54 ^{0}C

3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ISSR analizlerinde amplifikasyon reaksiyonu için; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) karışımı (1X Taq Buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.8 nmol primer, 0,5 U/µl Taq polimeraz) ayrıca, genomik DNA örnekleri (çizelge 4.19), PZR'de kullanılmak üzere 1 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. Sonra başlangıç denatürasyonu 94 ^{0}C'de 3 dakika, denatürasyon 94 ^{0}C'de 1 dakika, primer bağlanması 51-54 ^{0}C'de 1 dakika, zincirin uzaması 72 ^{0}C'de 1 dakika ve son uzama 72 ^{0}C'de 10 dakika olacak şekilde PZR koşulları ayarlanarak PZR uygulandı.

Çizelge 3.7. Polimeraz zincir reaksiyonu adımları

Reaksiyon Adımları	**Döngü Sayısı**	**Sıcaklık (^{o}C)**	**Süre (dakika)**
Başlangıç Denatürasyonu	1	94	03:00
Denatürasyon	40	94	01:00
Primerlerin Bağlanma Sıcaklığı		51-54	01:00
Uzama Safhası		72	01:00
Son Uzama Safhası	1	72	10:00
Bekleme	1	4	∞

3.7.3. Agaroz Jelde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Elektroforezi

PZR sonucu elde edilen örnekler, % 1,5'luk agaroz jelde (100 ml 0.5 X TBE buffer+ 1.5 g agaroz) incelendi. Jelde DNA'nın görüntülenebilmesi için floresan özellik gösteren boyar madde [Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (20,000x)] kullanıldı. PZR'den sonra her PZR ürünü boyama maddesi ile karıştırıldıktan sonra agaroz jele yüklendi. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için GeneRuler^{Tm} 100 bp, 50 bp DNA Ladder (Fermentas) kullanıldı. Jel, 200 Voltta 60 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında [MiniBIS Pro Visualizing System (DNr Bio-Imaging Systems)] UV ışık altında görüntülendi.

Çizelge 3.8. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

TBE Tamponu (10X)	Trisma Baz	890 mM
	EDTA	20 mM
	Borik Asit	890 mM
Yükleme Boyası (6X)	Bromofenol mavisi	0.25 % (w/v)
	Sukroz	40 % (w/v)
Red Safe	Red Safe Nükleik asit işaretleme çözeltisi	20,000x

3.7.4. Oluşan Bantların Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramlarının Oluşturulması

Örneklerin jel görüntülerinden elde edilen bantların büyüklükleri **"GenoSoft 3.8.2"** software programında analiz edildi. Daha sonra, her bir örnek için, bantların varlığında '1', yokluğunda ise '0'dan oluşan kodlarla Excel dosyasında bir veri matriksi oluşturuldu. Elde edilen veri matriksi, **"Popgen32"** programına konularak, Nei (1978)'nin genetik benzerlik ve genetik uzaklık ölçümüne göre çeşitlerin uzaklık ve benzerlik matriksi (Çizelge 4.19) oluşturuldu. Bu matrikse dayanılarak oluşturulan dendogram, **"TreeView"** programında görüntülendi (Şekil 4.20).

4. BULGULAR

Bu çalışmada dişi *P. khinjuk* ağaçlarından (Ağaç 1, Ağaç 2) alınan apikal ve lateral tomurcukların yüzey dezenfeksiyonu, kültür başlatılması, elde edilen eksplantlardan yeni sürgünlerin çoğaltılması, çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi, rejenerantların aklimatizasyonu ve bahçe koşullarına aktarılması ve somaklonal varyasyon analizi araştırmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doku kültüründe bitki rejenere etme evreleri ve somaklonal varyasyon analizi verilerine göre altı alt kısma ayrılarak sunulmuştur.

4.1. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Dezenfeksiyon Metodunun Gelişimi

Bu alt bölümde yapılan deneylerin amacı, apikal ve lateral sürgün uçlarından alınan materyalden her hangi bir mikro organizma ile bulaşık olmayan eksplantlar elde etmektir. Bu amaçla eksplantlar 5 dakika akan musluk suyunda yıkandıktan sonra 40 saniye %70'lik etil alkole maruz bırakıldı. Sterilant olarak NaOCI'nin farklı konsantrasyonları ve eksplantların sterilantta bekletilme süreleri test edildi. Elde edilen sonuç doğrultusunda yıl boyunca her ay alınan eksplantlardan en uygun ayın hangisi olduğu tespit edildi.

Eksplantın yüzey dezenfeksiyonu ile ilgili bütün deneyler 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcıda, yıkama işlemleri ise 1 saat boyunca elle yapılmıştır.

4.1.1. Dişi Buttum Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'nin Etkisi

Olgun dişi buttum ağacından alınan 20-30 mm boyundaki apikal ve lateral sürgünler dezenfeksiyon işlemine tabii tutulduktan sonra besi ortamına aktarıldı. Bu çalışmada, eksplant çeşitlerinde kullanılacak yüzey dezenfeksiyonu Onay (1996, 2000, Tilkat ve ark. 2009) tarafından antepfıstığı için kullanılan yüzey dezenfeksiyonu yöntemi yeniden test edilerek sonuçlar çizelge 4.1 ve 4.2'de sunulmuştur.

Enfekte olan, canlı kalan ve kahverengileşen eksplantların oranları, NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.1). Her deney için 80 eksplant kullanılmış ve NaOCl'nin her konsantrasyonu için 20

dakikalık bekletme süreleri denenmiştir. Yirmisekiz günlük inkübasyon sonunda kontrol gurubundaki eksplantların %96.1'i, %5'lik işlemde eksplantların %75'i, %10'luk işlemde %59.3'ü, %15'lik işlemde %56.1'i, %20'lik işlemde %53.6'sı ve %30'luk işlemde ise %48.4'ü enfekte olmuştur.

Çizelge 4.1. NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının yüzey dezenfeksiyonu üzerine etkisi

İşlemler(dakika)	Enfekte Olan Eksplant (%)	Canlı Kalan Eksplant (%)	Kahverengileşen Eksplant (%)
Kontrol	96.15 a	1.92 d	1.92 d
20 dk %5 NaOCl	75.00 b	19.23 b	5.76 c
20 dk %10 NaOCl	59.32 c	30.50 a	10.16 b
20 dk %15 NaOCl	56.07 c	12.14 c	34.57 a
20 dk %20 NaOCl	53.60 c	9.60 c	36.80 a
20 dk %30 NaOCl	48.38 d	12.90 c	38.70 a
χ^2(5df)	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 80 eksplantın ortalamasıdır.

Çizelge 4.1.'deki sonuçlara göre, NaOCl'nin artan konsantrasyonuyla kontaminasyon yüzdesinin azaldığı ancak kahverengileşme yüzdesinin arttığı görülmüştür. Canlı kalan eksplant oranının %10'luk NaOCl'te en yüksek, kontrol gurubunda ise en düşük olduğu tespit edilmiştir.

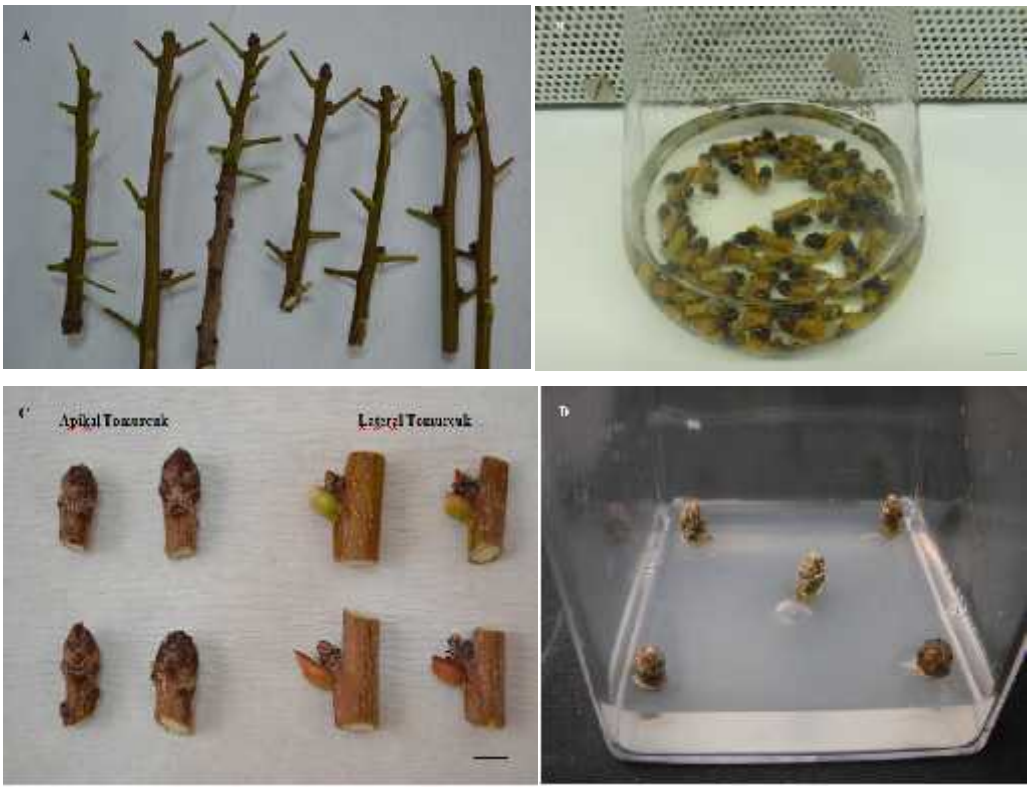
4.1.2. Eksplantların Yüzey Dezenfeksiyonu İçin NaOCl'de Optimum Çalkalama Süresinin Tespiti

Eksplantların yüzey dezenfeksiyonunda NaOCl'de bekletme süresinin etkili olduğu Çizelge 4.2'deki verilerde açık bir şekilde görülmektedir. Bekletme süresinin artışıyla enfeksiyon yüzdesinde azalma, kahverengileşme yüzdesinde ise artma olduğu görülmüştür. Canlı kalan eksplant yüzdesinin 20 ve 30 dakikalık bekletme sürelerinde bir birine yakın olduğu tespit edilmiştir. *İn vitro* ortamda kültüre alınan 20-30 mm boyundaki sürgünlerin %10'luk NaOCl'de 20 veya 30 dakika bekletildiğinde en etkili yüzey dezenfeksiyonu sonuçları elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. NaOCl'de çalkalanma sürelerinin yüzey dezenfeksiyonu üzerine etkisi

İşlemler (dakika)	Enfekte Olan Eksplant (%)	Canlı Kalan Eksplant (%)	Kahverengileşen Eksplant (%)
Kontrol	96.15 a	1.92 d	1.92 d
5 dk. %10 NaOCl	84.94 a	9.67 c	5.37 c
10 dk. %10 NaOCl	77.41 b	12.75 b	9.67 b
20 dk. %10 NaOCl	59.32 c	30.50 a	10.16 b
30 dk. %10 NaOCl	56.25 c	32.50 a	11.25 b
40 dk. %10 NaOCl	52.26 c	15.38 b	32.35 a
χ^2(5df)	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 80 eksplantın ortalamasıdır



Şekil 4.1. Dişi ağaçtan alınan yıllık sürgünlerden kültür başlatma çalışmaları
A) sürgünler (Bar: 10 mm),
B) sodyum hipokloritte yüzey dezenfeksiyonu (Bar: 14.3 mm)
C) Yüzey dezenfeksiyonundan sonra yatay hava akışlı kabinde apikal ve lateral sürgün uçları (Bar: 8.5 mm)
D) Kültüre alınmış apikal sürgünler (Bar: 5.4 mm)

4.2. Kültür Başlatma Çalışmaları

Proliferasyon çalışmalarında kullanılacak eksplantların elde edilebilmesi için yapılan kültür başlatma çalışmalarında apikal ve lateral tomurcuklardan gelişen sürgünler 14 günde bir alt kültüre alınmış ve veriler 28. günde alınmıştır.

Bu bölümde olgun dişi buttum ağaçlarından alınan sürgün uçlarından kültür başlatılması için, kültüre alınan eksplant çeşidinin etkisi, sitokininlerin etkisi, en iyi sitokinin farklı konsantrasyonlarının etkisi çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalar sırasıyla ilgili alt bölümlerde verilmiştir.

4.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi

Bu deneyde sürgün proliferasyonu için meristematik apikal ya da lateral uçlar (20-30 mm) kullanıldı. Çizelge 4.2.'deki yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulan eksplantlar, 5-10 dakika yatay hava akışlı kabinde bekletildikten sonra 1 mgl^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında inkübe edildi. İnkübasyondan 4 hafta sonra sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı rapor edilip sonuçlar Çizelge 4.3'te verildi.

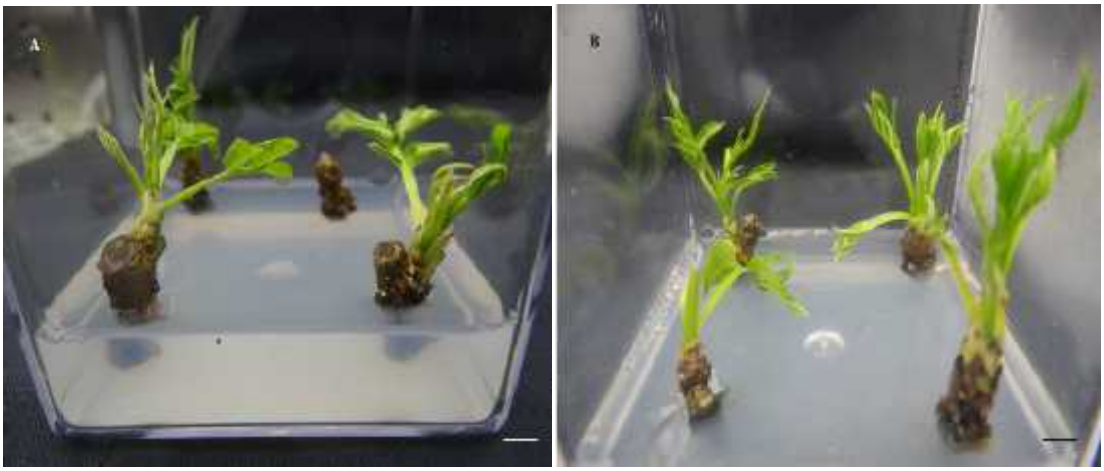
Sürgün ucu kültürlerinin başlatılmasına eksplant çeşidi etkisinin incelendiği bu deneyde, apikal sürgünlerden elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu, lateral sürgünlerden elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğundan daha fazla, fakat eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı bir birine yakın değerde olduğu görülmüştür. İnkübasyonun 14. gününde kültüre alınan apikal uçlarda gözle görülür şekilde uzama fark edilmiştir. Süren eksplantların yapraklarında sararma, kuruma ve kıvrılma görülmemiştir. Besi ortamı ile temas eden eksplantların bazal bölgelerinde kallus oluşmamıştır. Süren sürgünlerde vitrifikasyon az da olsa gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kültür başlatılmasına eksplant tipinin etkisi

Eksplant Tipi	Ortalama Sürgün Sayısı ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH
Apikal Tomurcuk	1.40 ± 0.07a	16.62 ± 1.24a
Lateral Tomurcuk	1.37± 0.05a	13.05 ± 1.27b

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 80 eksplantın ortalamasıdır.
Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer
bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak
farklı olduğunu gösterir.

Eksplantlarda primer yapraklar kültürün 10. gününde, sekonder yaprak oluşumu ise inkübasyonun ikinci haftasının sonunda görülmüştür. Bütün yaşayan eksplantlarda sürgün uçları 4 haftalık kültürde apikal uçlar için ortalama sürgün sayısı 1.40 ve ortalama sürgün uzunluğu 16.62 mm olduğu görülmüştür. Çizelge 4.3'teki verilere göre elde edilen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından apikal sürgünler lateral sürgünlerden daha iyi sonuç vermiştir. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde apikal sürgünlerin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.2. Kültürün 21. gününde lateral ve apikal tomurcuklar
A) Lateral tomurcuklar (Bar: 5.00 mm),
B) Apikal tomurcuklar (Bar: 6.50 mm)

4.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin Etkisi

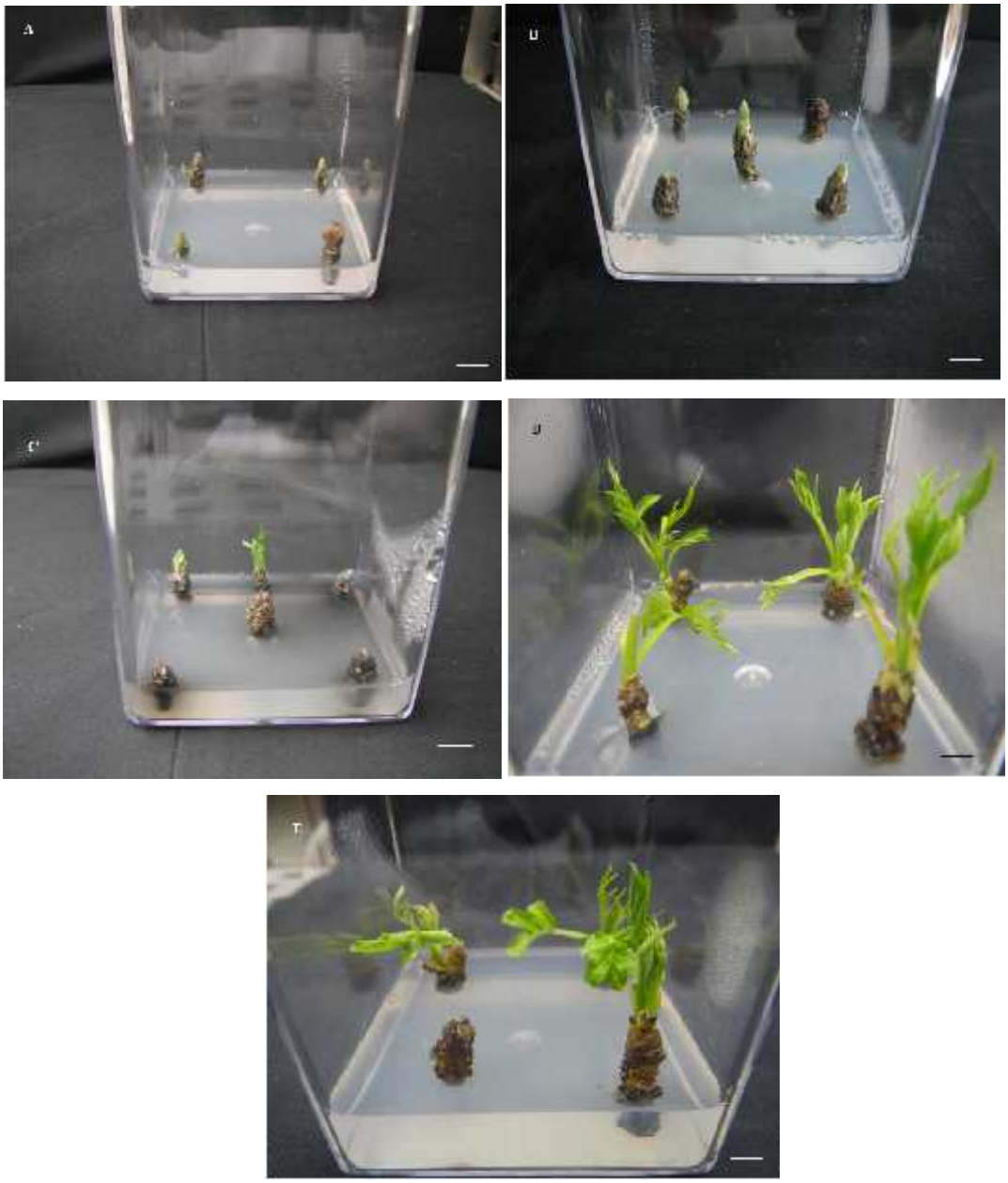
Yirmisekiz günlük kültür süresi sonunda test edilen sitokinin çeşitlerinin (2iP, Kinetin, BA, TDZ), kültüre alınan eksplantların organojenez potansiyelleri üzerine farklı etki yaptıkları tespit edilmiştir. Kültürlerin başlatılmasından sonra 14. günden itibaren sürgün uzaması ve proliferasyon görülebilir duruma gelmiştir. Deneylerde süren sürgünlerin hiç birinde sürgün ucu nekrozu görülmemiştir. Süren sürgünlerin bazılarında düşük düzeyde vitrifikasyon görülmüştür. Hiçbir sitokinin çeşidinde besi ortamı ile temas eden apikal ya da lateral sürgünlerin bazal kısımlarında kallus oluşumu görülmemiştir.

Çizelge 4.4. Kültür başlatılmasına sitokininlerin etkisi

Sitokinin Tipi (1 mgl^{-1})	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
Kontrol	1.07 ± 0.04 b	12.35 ± 1.17 c
2iP	1.10 ± 0.03 b	15.05 ± 0.94 b
Kinetin	1.07 ± 0.02 b	7.80 ± 0.57 d
BA	1.47 ± 0.04 a	20.37 ± 0.83 a
TDZ	1.35 ± 0.03 a	17.95 ± 0.61 a

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 40 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Ortalama sürgün sayısı bakımından 2iP ve kinetin kontrole yakın değerler gösterirken, TDZ ve BA daha yüksek ve birbirine yakın değerler göstermiştir. Bu gurupta en yüksek değer BA ortamında 1.47 adet olarak saptanmıştır. Ortalama sürgün uzunluğuna bakıldığında en iyi sonuçları TDZ ve BA göstermiştir. Sürgün uzunluğu BA deney gurubunda 23.37 mm ile en yüksek değere ulaşmıştır. Hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu bakımından BA en iyi değerleri vermiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3). Ayrıca BA'nın birim fiyatı TDZ'den çok daha düşük olduğu için bundan sonraki çalışmalarda kültür başlatılmasına ve sonraki deneyde ise BA'nın farklı konsantrasyonları kültür başlatılmasına etkisi araştırıldı.



Şekil 4.3. Kültürün 21. gününde farklı sitokinin destekli MS besi ortamında tomurcukların gelişmesi
A) Kontrol (Bar: 6.03 mm)
B) 2iP (Bar: 6.82 mm),
C) Kinetin (Bar: 5.71 mm)
D) BA (Bar:6.06 mm)
E) TDZ (Bar: 6.66 mm)

4.2.3. Kültür Başlatılmasına BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Yirmisekiz günlük kültür süresi sonunda test edilen BA konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 4, 8 $mg1^{-1}$) hem ortalama sürgün sayısı hem de ortalama sürgün uzunluğunu etkilediği gözlenmiştir. Lateral tomurcuklardan kültür başlatılmasında 2 mgl^{-1} BA ile

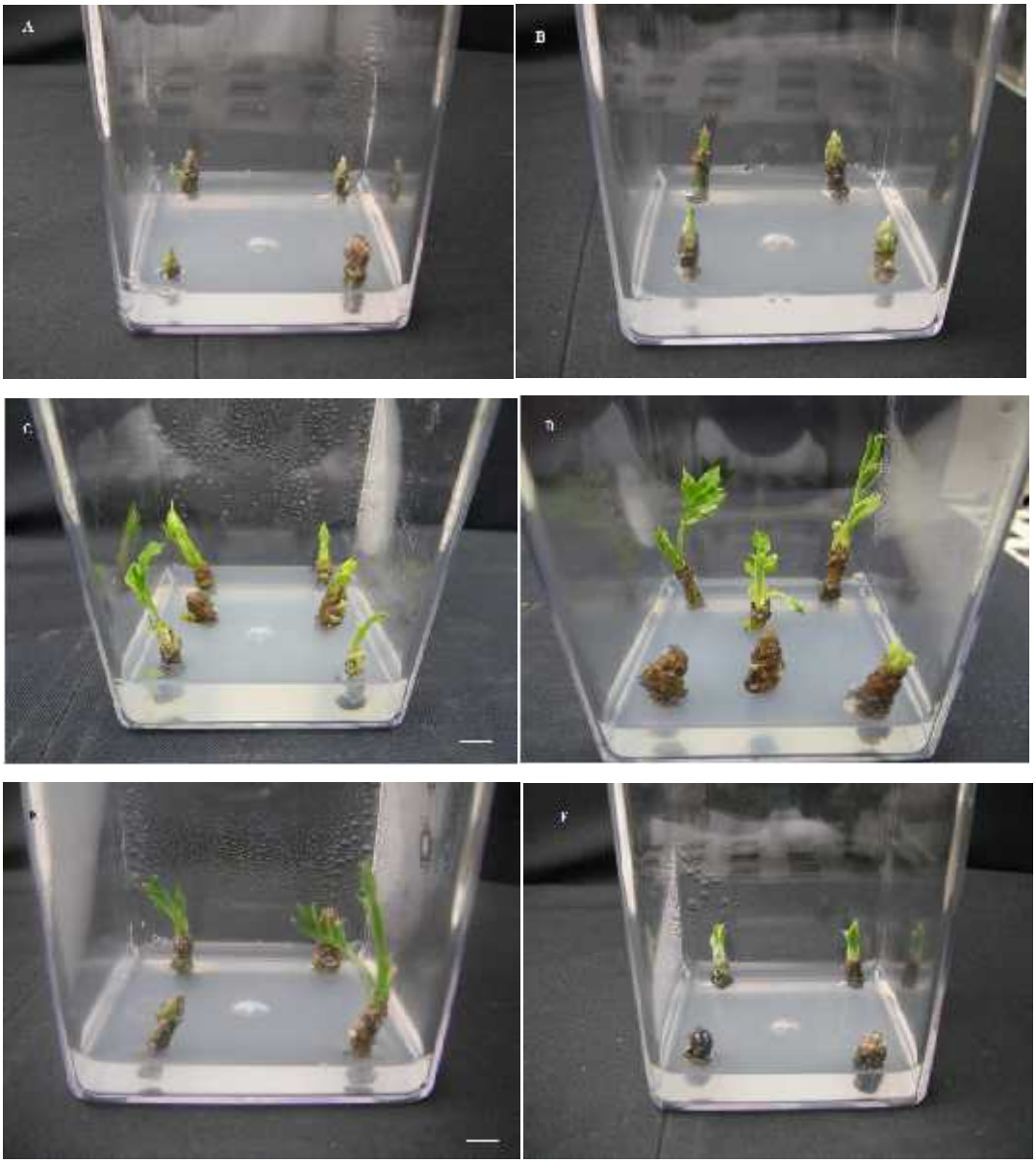
destekli ortamda ortalama 1.93 sürgün sayısı ile maksimum sonuç elde edilmiştir. En düşük ortalama sürgün sayısı kontrol gurubunda 1.07 adet ile görülürken 4 ve 8 mg l^{-1} BA destekli deney gurupları kontrol gurubuna yakın değerler göstermiştir. Yirmisekiz günlük kültür dönemi sonunda oluşan sürgün uzunluğu bakımından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından test edilen guruplar arasında da maksimum sonuç ortalama 24.03 mm ile 2 mgl^{-1} BA destekli MS besi ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Deney guruplarının hiç birinde eksplantın besi ortamı ile temas ettiği bazal kısımda kallus oluşmamıştır. Deney guruplarında az sayıda sürgün vitrifiye olmuş ve guruplar arasında vitrifikasyon oranı ve miktarı bakımından farklılık görülmemiştir. BA konsantrasyonundaki artışın süren sürgünler arasında her hangi bir morfolojik farklılığa etki etmediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Kültür başlatılmasına BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

BA konsantrasyonu (mgl^{-1})	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
Kontrol	1.07 ± 0.01c	12.35 ± 0.51b
0.5	1.11 ± 0.06c	13.07 ± 1.68b
1.0	1.47 ± 0.03b	23.37 ± 0.68a
2.0	1.93 ± 0.07a	24.03 ± 1.02a
4.0	1.18 ± 0.04c	11.31 ± 0.97b
8.0	1.08 ± 0.02c	11.08 ± 0.58b

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 30 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Bu sonuçlara göre, olgun dişi buttum ağaçlarından *in vitro* kültür başlatılması için eksplant olarak apikal tomurcuklar kullanılmalı ve önce %70 lik etil alkolde 40 saniye sonra ticari NaOCI'nin %10'luk konsantrasyonunda 30 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulmalıdır. Steril olan apikal tomurcuklar 2 mgl^{-1} BA destekli modifiye edilmiş MS besi ortamında kültüre alınması ile iyi sonuçların elde edilebileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. 28. günde BA'nın farklı konsantrasyon etkisi
A) Kontrol (Bar: 6.19 mm)
B) 0.5 mgl^{-1} BA (Bar: 6.34 mm)
C) 1 mgl^{-1} BA (Bar: 6.33mm)
D) 2 mgl^{-1} BA (Bar: 7.30 mm)
E) 4 mgl^{-1} BA (Bar: 7.75 mm)
F) 8 mgl^{-1} BA(Bar: 6.03 mm)

4.2.4. Kültür Başlatılması İçin En Uygun Zamanın Seçilmesi

Olgun dişi buttum ağaçlarından alınan sürgün uçlarından *in vitro* kültür başlatılmasına en uygun zamanın seçilmesi deneylerinde bölüm 4.1.2. de elde edilen optimum değerler kullanılarak yıl boyunca her ay alınan sürgün uçlarından kültür başlatma çalışmaları yapılmıştır. Bu deneylere göre haziran, temmuz, ağustos, ve eylül

aylarında yaşayan eksplant oranı, ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu istatiksel olarak büyük fark göstermediği halde en iyi sonuçlar ağustos ayında alınan apikal tomurcuklardan elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre ağustos ayında yaşayan eksplant oranı %32.75, ortalama sürgün sayısı 1.93, ortalama sürgün uzunluğu 24.03 mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.6). Kültür başlatmada haziran, temmuz, ağustos, ve eylül aylarının dışındaki aylarda kontaminasyon oranı çok yüksek olduğu için yaşayan ekplant yüzdeleri düşmüş, aynı zamanda sürgün sayısı ve uzunluğunda da benzer değerlerin olduğu görülmüştür. Sürmüş olan eksplantlarda sürgün ucu nekrozları hiçbir zaman periyodunda görülmemiştir. Ancak kış ve ilkbahar mevsiminde süren eksplantların vitrifikasyon oranı yaz ve sonbahar mevsiminde süren eksplantlardan daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.6. Kültür başlatılmasına yılın en uygun döneminin etkisi

Eksplant Alınış Tarihi	**Yaşayan Eksplant (%)**	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
10.05.2012	10.14 c	1.86 ± 0.08 a	21.89 ± 0.27 a
17.06.2012	12.18c	1.90 ± 0.07 a	22.00 ± 0.58 a
15.07.2012	30.85a	1.87 ± 0.01 a	23.37 ± 0.68 a
14.08.2012	32.75a	1.93 ± 0.07a	24.03 ± 1.02 a
12.09.2012	22.19b	1.82 ± 0.06 a	23.29 ± 0.26 a
13.10.2012	10.47 c	1.79 ± 0.08 ab	21.60 ± 0.18 ab
10.11.2012	5.54 e	1.45 ± 0.02 b	20.90 ± 0.64 ab
15.12.2012	6.76 d	1.20 ± 0.08 bc	18.24 ± 0.40 b
12.01.2013	8.01 d	1.12 ± 0.08 c	15.36 ± 0.48 c
16.02.2013	7.24 d	1.02 ± 0.03 c	14.87 ± 0.14c
16.03.2013	8.80 d	1.03 ± 0.04 c	15.01 ± 0.35 c
20.04.2013	7.70 d	1.60± 0.06 ab	20.32 ± 0.60ab
X^2(df 11)	P < 0.05		

Veriler, 2 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamında 28. gün sonunda alınmıştır.
Her deney için 80 sürgün ucu kullanılmıştır.
Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

4.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

Proliferasyon çalışmalarında kullanılan eksplantlar, *in vitro* kültür başlatma deneylerinde süren apikal ve lateral tomurcuklardan gelişen sürgünlerdir. Bu sürgünler 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamında alt kültüre alınmıştır. İlk alt kültürde hiçbir eksplant kallus oluşturmamış ancak prolifere olmadığı ve eksplantlarda az da olsa vitrifikasyonun olduğu gözlenmiştir. Bu eksplantlar 14 günde bir alt kültüre alınmış ve geçen 5 aylık zaman diliminde eksplantların giderek artan oranda kallus oluşturduğu ve bununla beraber prolifere olduğu tespit edilmiştir. Eksplantlarda görülen vitrifikasyonun her alt kültürde azalmaya devam ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro* çoğalan sürgünlerin kültür şartlarına daha kolay uyum sağladığı görülmüştür. Kültür koşullarına uyum sağlayan eksplantlar 28 günde bir alt kültürü yapılmak üzere proliferasyon deneylerinde kullanılmıştır.

4.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi

Eksplantlar 1 mgl^{-1} BA ile desteklenmiş ve 7 gr agar ile katılaştırılmış Murashige Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) ve Shenk ve Hildebrant (SH) besi ortamına aktarıldı. Yirmi sekiz günlük kültür sonunda, test edilen üç farklı besi ortamı arasında ortalama sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu, kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve prolifere olan eksplant yüzdesi bakımından istatistiksel farklılıkların olduğu gözlendi. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığında, eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı ve eksplantların ortalama sürgün uzunluğu değerinin WPM ve MS besi ortamlarında birbirine yakın sonuçlar verdiği gözlenmiş ve en iyi sonucun MS besi ortamında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Ayrıca kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve prolifere olan eksplant yüzdesi karşılaştırıldığında uygulama guruplarının kontrolden çok daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Deney gurupları kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında tüm parametreler bakımından önemli farklılıkların olduğu görülmektedir. Yirmisekiz günün sonunda makro ve mikro besin elementlerinden yoksun olan kontrol gurubundaki eksplant sürgünlerinin kuruduğu görülmüş ve en iyi sonucun MS besi ortamında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5).

Eksplantların kesilmiş ve besi ortamıyla temas eden bazal kısımlarında oluşan kallus hacmi bakımından MS besi ortamında bulunanların, WPM ve SH besi ortamında

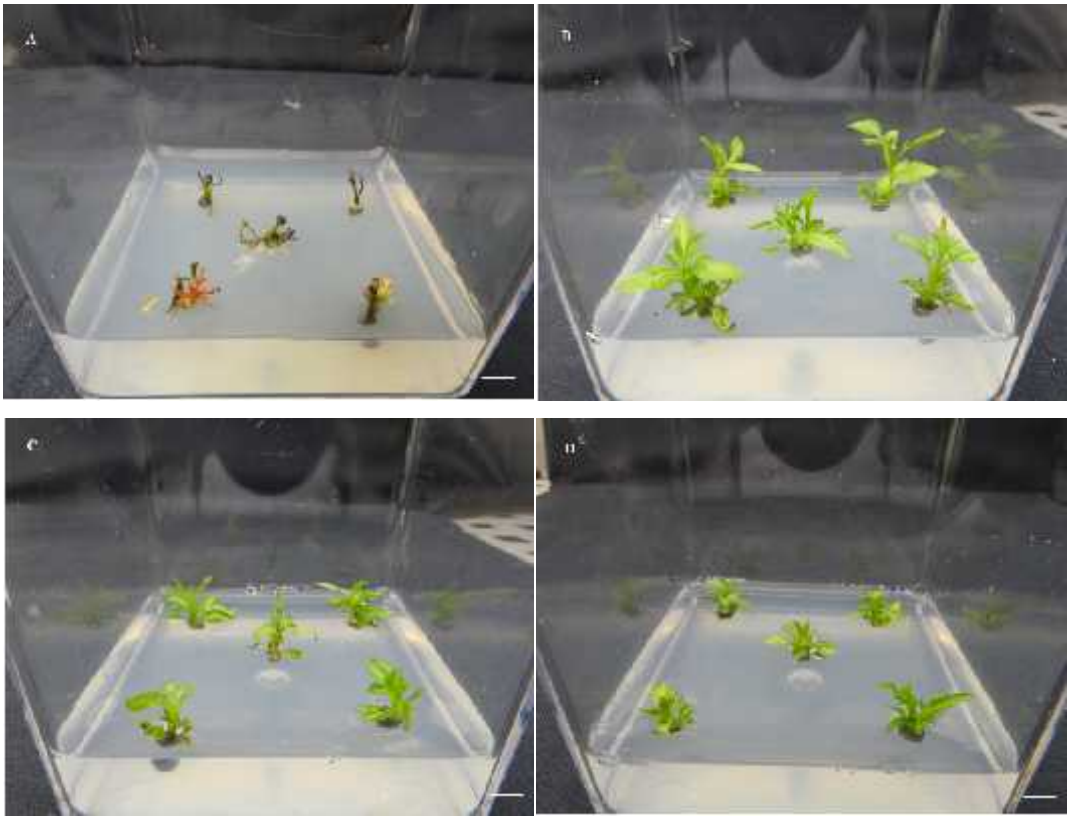
kültüre alınan eksplantlardan daha büyük olduğu saptanmıştır. Kontrol gurubunda ise kallusun oluşmadığı tespit edilmiştir.

Uygulamanın yapıldığı besi ortamlarında kallus rengi farklılaşmamıştır. MS ve WPM besi ortamlarında görülmeyen sürgün ucu nekrozu kontrol gurubu ve SH besi ortamlarında gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Sürgün proliferasyonuna besi ortamı tipinin etkisi

Besi Ortamı Çeşidi	**Prolifere olan eksplant (%)**	**Kallus Oluşturan Eksplant (%)**	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
Kontrol	0.00 c	35.00 c	0.72 ± 0.08 c	7.30 ± 0.29 c
WPM	65.80 a	75.80 a	1.80 ± 0.09 a	17.05 ± 0.38 a
SH	55.40 b	60.00 b	1.40 ± 0.07 b	15.45 ± 0.31 b
MS	70.30 a	80.65 a	1.95 ± 0.09 a	18.10 ± 0.34 a
X^2(df 3)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.5. Sürgün proliferasyonuna besi ortamı tipinin etkisi
A) Kontrol (Bar: 8.40 mm)
B) MS (Bar: 8.70 mm)
C) SH (Bar:9.04 mm)
D) WPM (Bar: 8.73 mm)

4.3.2. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortamının Farklı Kuvvetlerinin Etkisi

Eksplantlar 1 mgl^{-1} BA ile desteklenmiş ve 7 gr agar eklenmiş katı MS besi ortamının 1/4, 1/2, 1/1, 2/1, kuvvetleri ile test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. 1/1 MS ile 2/1 MS arasında istatistiksel olarak çok az bir farkın olduğu gözlenmişse de eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (1.95) prolifere olan eksplant (70.30) parametrelerinde 1/1 MS'in daha avantajlı olduğu görülmektedir. Tüm parametreler 1/4 MS'in bulunduğu ortamda en düşük değerler göstermiştir. MS konsantrasyonundaki artışın 1/1 değerine kadar olumlu etki ettiği ancak daha yüksek olan 2/1 konsantrasyonunda çok azda olsa yeni oluşan sürgün sayısına olumsuz etki ettiği görülmüştür.

Çizelge 4.8. Sürgün proliferasyonuna MS'in farklı kuvvetlerinin etkisi

MS Kuvveti	Prolifere olan eksplant (%)	Kallus Oluşturan Eksplant (%)	Ortalama Sürgün Sayısı ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH
1/4	58.00 b	65.00 c	1.60 ± 0.08 d	16.10 ± 0.29 b
1/2	60.80 b	70.00 b	1.80 ± 0.09 c	16.20 ± 0.38 b
1/1	70.30 a	80.65 a	1.95 ± 0.09 a	18.10 ± 0.34 a
2/1	68.30 a	80.65 a	1.90 ± 0.09 a	18.40 ± 0.34 a
X^2(df 3)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

4.3.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi

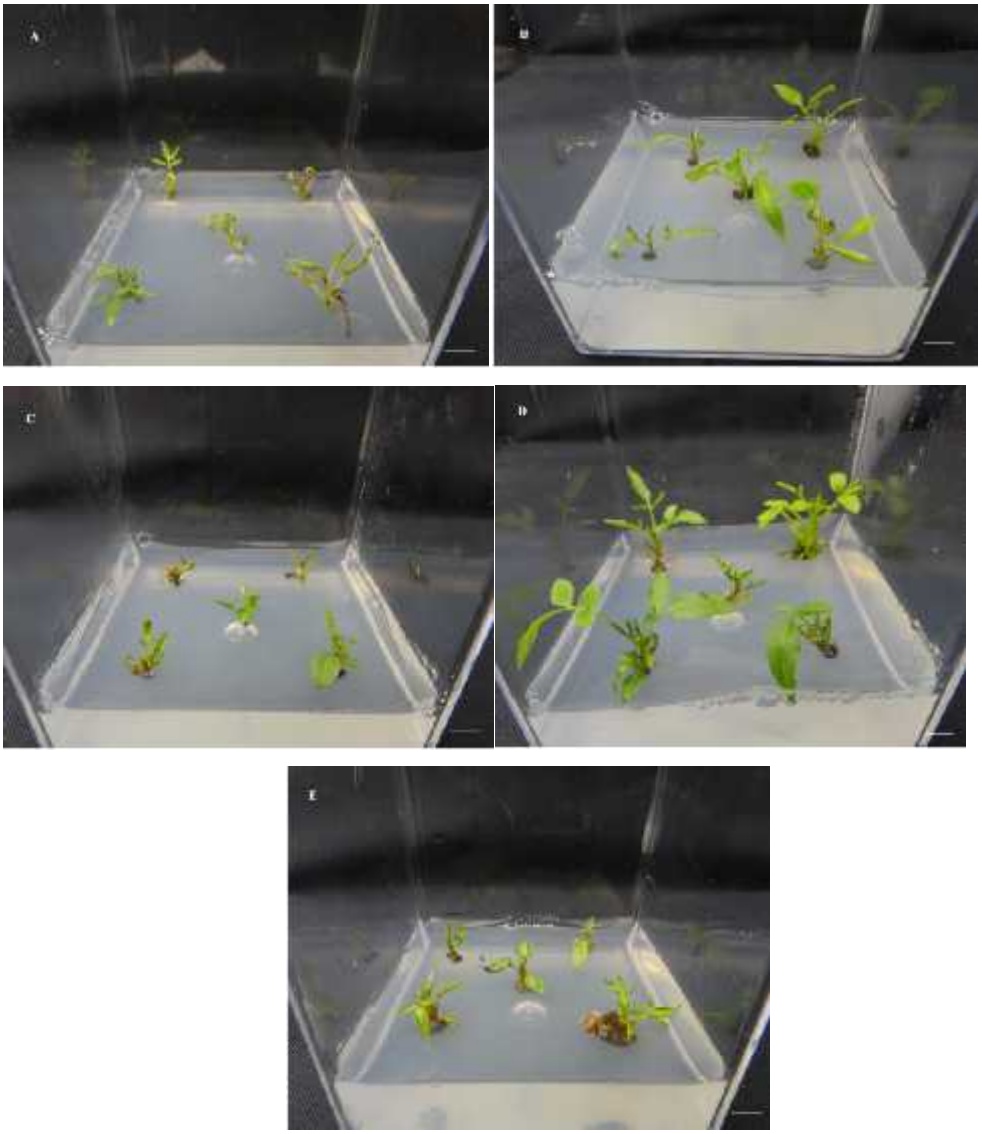
Bitki büyüme düzenleyicilerin test edildiği bu deney gurubunda önceki deneyde en iyi besi ortamı olarak ortaya çıkan MS besi ortamına 1 mgI^{-1} konsantrasyonun da sitokinin (2iP, Kinetin, BA, TDZ) çeşitleri ilave edilerek yapılan deney sonuçları Çizelge 4.9 ve şekil 4.6'da verilmiştir. Bu denemeler sonucunda eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı ölçümleri karşılaştırıldığında, bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol gurubu en düşük değerlerde olduğu ortaya konmuştur. Kinetin ile 2iP deney gurubunun birbirine yakın değerde olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi sonucun 1.95 ile benziladenin (BA) de olduğu en düşük değerin 0.85 ile kontrol gurubunda olduğu tespit edilmiştir. Eksplantların ortalama sürgün uzunluğu karşılaştırıldığında en iyi sonucun 21.60 mm ile 2iP de olduğu en düşük değerin ise 10.90 mm ile kontrol gurubunda olduğu gözlenmiştir. Bu deneyde en iyi sonucun BA da olduğu ortaya çıkmıştır. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi karşılaştırıldığında kontrol gurubunda kallusun hiç oluşmadığı görülürken BA uygulamasında yüzde 80 ile en yüksek değer ortaya çıkmıştır. En büyük kallus hacminin TDZ uygulanan eksplantlardan elde edilmesine karşın prolifere olan eksplant yüzdesi, ortalama sürgün uzunluğu ve ortalama sürgün sayısı BA uygulananlara göre daha düşük değerler göstermiştir. Kontrol gurubunda eksplantlar prolifere olmamış ve yapraklar küçük ve dar kalmış, ayrıca kuruma görülmüştür. Yapraklarda sararmanın en çok kinetin uygulanan ortamda olduğu tespit edilmiş ve kallus oluşturan eksplant

yüzdesi bakımından da diğer sitokininler içinde en düşük değer kinetinden (%35) elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Sürgün proliferasyonuna sitokininlerin etkisi

Sitokinin Tipi (1.0 mg1^{-1})	**Prolifere olan eksplant (%)**	**Kallus Oluşturan Eksplant (%)**	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
Kontrol	0.00 d	0.00 d	0.85 ± 0.08 d	10.90 ± 081 d
2iP	40.45 c	45.05 b	1.30 ± 0.00 c	21.60 ± 0.15 a
Kinetin	30.00 c	35. 90 c	1.25 ± 0.03 c	18.80 ± 0.07 b
BA	85.10 a	80.30 a	1.95 ± 0.90 a	18.10 ± 0.34 bc
TDZ	70. 95 b	75.65 a	1.45 ± 0.08 b	17.40 ± 0.36 c
X^2(df 4)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P = 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.6. Proliferasyona sitokininlerin etkisi
A) Kontrol (Bar: 8.73 mm)
B) 2iP (Bar: 7.46 mm)
C) Kinetin (Bar: 8.88 mm)
D) BA (Bar: 8.80 mm),
E) TDZ (Bar: 8.73 mm)

4.3.4. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

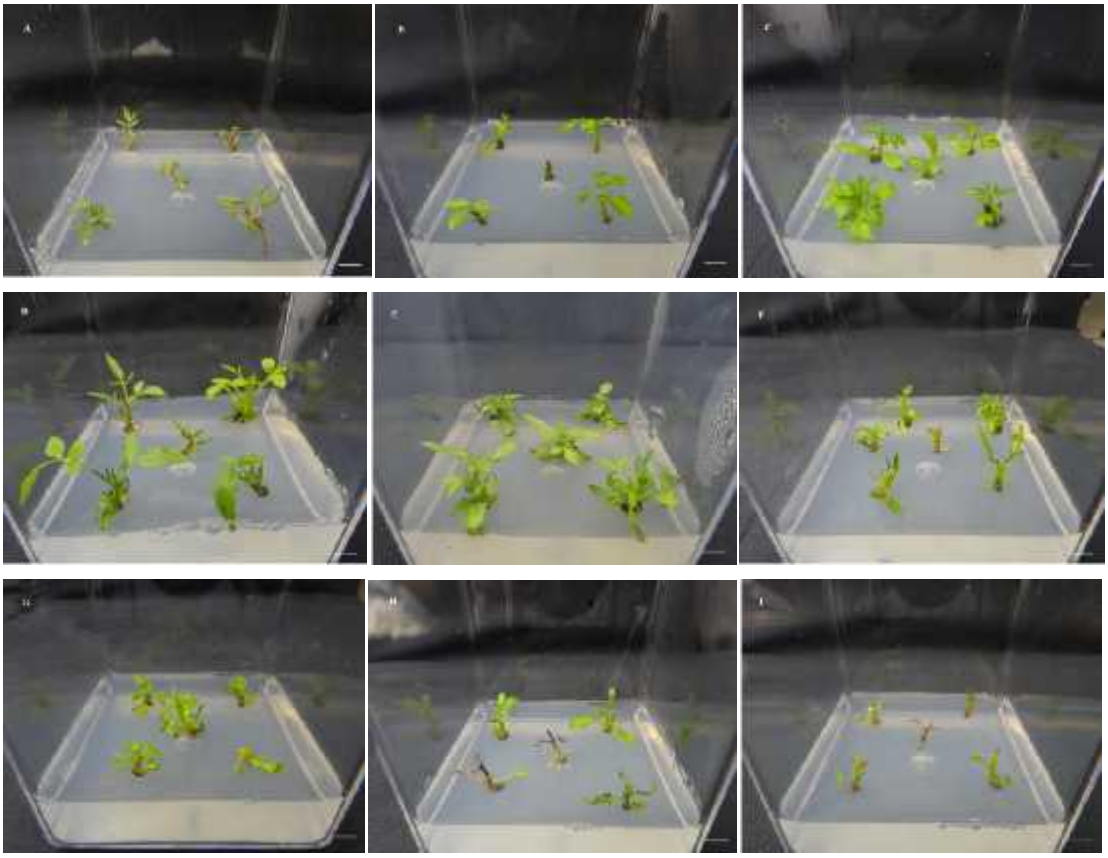
Bir önceki deneyde sürgünlerin proliferasyonuna en iyi cevap veren sitokinin çeşidinin BA olduğu tespit edildi. Bu deney de ise, MS ortamında BA'nın farklı konsantrasyonları (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mgI^{-1}), BA içermeyen kontrol gurubu ile çalışıldı ve sonuçlar Çizelge 4.9 ve şekil 4.7'de verildi. Bu çalışmada en iyi sonucun 2 mgl^{-1} BA da olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.10). Ortalama sürgün sayısı bakımından

en yüksek değer (2.15) 2 mgl^{-1} BA uygulanan guruptan, en düşük değer (0.85) ise, kontrol gurubunda saptanmıştır. Ortalama sürgün uzunluğunda en yüksek değer (19.10 mm) 2 mgl^{-1} BA uygulanan gurupta, en düşük değer (10.90 mm) ise, kontrol gurubunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Uygulama gruplarının tamamında ortalama sürgün sayısı kontrol gurubundan daha iyi sonuç vermiştir. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi %90 ile 2 mgl^{-1} BA uygulama gurubunda, çoğalan eksplant yüzdesi %85 ile 1 ve 2 mgl^{-1} BA uygulama guruplarında en yüksek değere ulaşmıştır. Kallus oluşturan ve prolifere olan eksplant yüzdeleri 4 mgl^{-1} BA'dan daha yüksek konsantrasyonlarda pek değişmemiştir. Morfolojik olarak 6,8 ve 10 mgl^{-1} BA uygulama guruplarındaki eksplantlarda gövde, besi ortamı ile temas eden kısımdan 1-2 mm yukarıya doğru kalınlaşmış ve rengi turuncuya yakın bir renge dönüşmüştür. Kalınlaşmış olan gövdede yeni sürgünler çok nadir olarak gelişmiş ve kalınlaşan gövdelerdeki sürgün ucu tomurcuk pulları kızıllaşmış, yaprak ayaları küçülmüş ve yapraklarda kıvrılma görülmüştür. Kontrol gurubundaki eksplantlarda yapraklarda nekrozlu bölgeler ve yaprak iletim demetlerinde kızıllık tespit edilmiştir. 0.5, 1 ve 2 BA mgl^{-1} deney gurubundaki eksplantlarda diğer uygulama guruplarına göre yaprak renginin daha yeşil olduğu, gövdede kalınlaşmanın olmadığı, sürgün uçlarında kızıllaşmanın çok az olduğu ve yapraklarda nekrozlu bölgelerin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Sürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

BA konsantrasyonu (mgl^{-1})	**Prolifere Olan Eksplant (%)**	**Kallus Oluşturan Eksplant (%)**	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
Kontrol	0.00 d	0.00 d	0.85 ± 0.08 f	10.90 ± 0.81 e
0.25	60.00 c	65.30 c	1.35± 0.09 d	18.70 ± 0.73 a
0.5	65.75 b	75.85 b	1,60 ± 0.07 c	18.80± 0.30 a
1.0	85.10 a	80.30 b	1.95 ± 0.06 b	18.10 ± 0.24 ab
2.0	85.50 a	90.80 a	2.15 ± 0.07 a	19.10 ± 0.26 a
4.0	70.20 b	70.90 b	1.45 ± 0.06 cd	16.80 ± 0.30 c
6.0	65.10 b	60.10 c	1.15 ± 0.04 e	17.05 ± 0.36 c
8.0	65.00 b	60.30 c	1.10 ± 0.02 e	18.35 ± 0.18 a
10.0	65.55 b	65.40 c	1.10 ± 0.03 e	15.90 ± 0.22 d
X^2(df 8)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.7. Sürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi
A) Kontrol (Bar:8.73 mm)
B) 0.25 mgl^{-1}(Bar:8.70 mm)
C) 0,5 mgl^{-1}(Bar: 8.72 mm)
D) 1 mgl^{-1} (Bar: 8.73 mm)
E) 2 mgl^{-1} (Bar: 8.72 mm)
F) 4 mgl^{-1} (Bar: 8.70 mm)
G) 6 mgl^{-1} (Bar: 9.20 mm)
H) 8 mgl^{-1} (Bar: 8.70 mm)
İ) 10 mgl^{-1} (Bar: 8.72 mm)

4.3.5. Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin Oksin Kombinasyonunun Etkisi

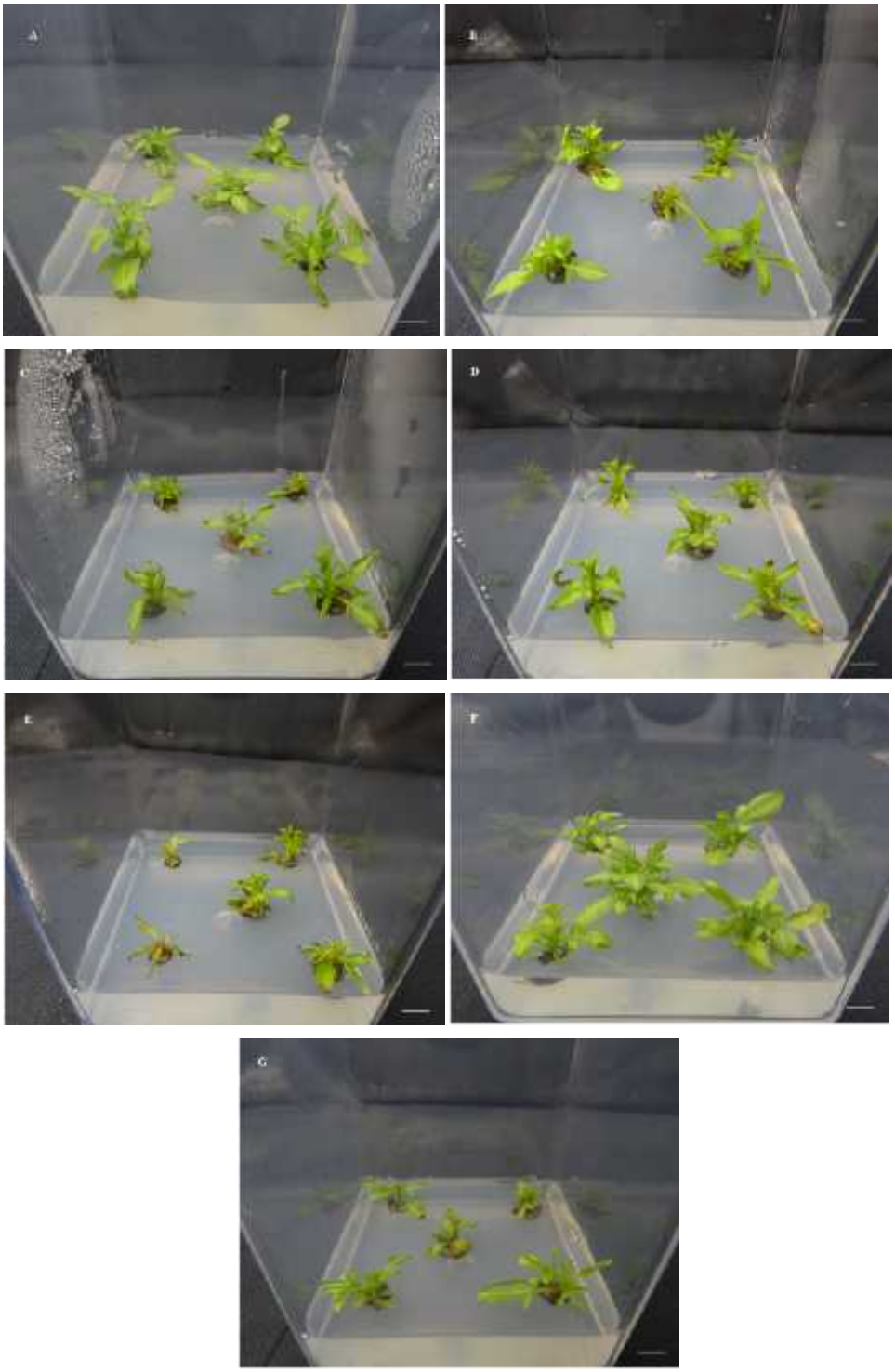
Sürgün proliferasyonuna en iyi cevap veren 2 $mg1^{-1}$ BA olduğu önceki deneyde tespit edildi. Bu deneyde bu sitokinin konsantrasyonu kontrol gurubu olmak üzere çeşitli oksinler ve çeşitli konsantrasyonlarının ilave edilmesiyle sürgün proliferasyonu üzerine etkileri araştırılıp sonuçlar Çizelge 4.11 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Ortalama sürgün sayısı en yüksek 2.55 değeri ile 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA deney gurubunda, en düşük 1.20 değeri ile 2 mgl^{-1} BA+0.3 mgl^{-1} IAA deney gurubunda olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı oksinin yüksek konsantrasyonu ortalama sürgün sayısında azalmaya neden olmuştur. Ortalama sürgün sayısı artarken ortalama sürgün uzunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu en yüksek 19.10 mm ile kontrol

gurubunda, en düşük 14.50 mm ile 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IAA deney gurubunda olduğu ortaya çıkmıştır. Eksplantın besi ortamıyla temas eden bazal kısmında kallus oluşturan eksplant yüzdesinin 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA deney gurubunda %95 değeri ile en yüksek, 2 mgl^{-1} BA+0.3 mgl^{-1} IAA deney gurubunda %75 değeri ile en düşük olduğu tespit edilmiştir. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından diğer gurupların birbirine yakın sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır. Prolifere olan eksplant yüzdesi 2 mgl^{-1} BA+0.3 mgl^{-1} IAA deney gurubunda %60 değeri ile en düşük, 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA deney gurubunda %90 değeri ile en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kontrol gurubu uygulama gurupları ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlu (0.1 mgl^{-1}) oksinlerin kallus yüzdesini artırdığı ve paralelinde sürgün sayısını artırdığı görülmüş, ancak ortalama sürgün uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. Deney guruplarında eksplantlarda sürgün ucu nekrozu, yapraklarda kıvrılma ve sararma önceki deneylerle (Sitokinin çeşidi ve BA konsantrasyonu) karşılaştırıldığında önemsiz denecek kadar az oluşmuştur.

Çizelge 4.11. Sürgün proliferasyonuna sitokinin/oksin kombinasyonunun etkisi

Sitokinin / Oksin (mgl^{-1})	**Prolifere Olan Eksplant (%)**	**Kallus Oluşturan Eksplant (%)**	**Ortalama Sürgün Sayısı ± SH**	**Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH**
2 mgl^{-1} BA (Kontrol)	85.20 b	90.90a	2.15 ± 0.07 b	19.10 ± 0.26 a
2 mgl^{-1} BA/ 0.1 mgl^{-1} NAA	85.90 b	90.50 a	2.15± 0.13 b	15.40 ± 0,29 cd
2 mgl^{-1} BA / 0.3 mgl^{-1} NAA	70.45 c	80.10 b	1.35 ± 0.06 d	18.85± 0,43 a
2 mgl^{-1} BA / 0.1 mgl^{-1} IAA	85.30 b	90.40 a	2.25 ± 0.09 b	14.50 ± 0.25 d
2 mgl^{-1} BA / 0.3 mgl^{-1} IAA	60.75 d	75.20 b	1.20 ± 0.04 d	16.80 ± 0.15 b
2 mgl^{-1} BA / 0.1 mgl^{-1} IBA	90.80 a	95.00 a	2.55 ± 0.05 a	15.50 ± 0.18 c
2 mgl^{-1} BA / 0.3 mgl^{-1} IBA	80.95 b	80.00 b	1.90 ± 0.04 c	15.05 ± 0.20 cd
X^2(df 6)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır.
Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.8. Sürgün proliferasyonuna sitokinin/oksin kombinasyonunun etkisi
A) Kontrol 2.0 mgl^{-1} BA (Bar: 8.09 mm)
B) 2.0 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} NAA (Bar: 8.40 mm)
C) 2.0 mgl^{-1} BA+0.3 mgl^{-1} NAA (Bar: 7.60 mm)
D) 2.0 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} (Bar: 7.93)
E) 2.0 mgl^{-1} BA+0.3 mgl^{-1} IAA (Bar: 7.46 mm)
F) 2.0 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA (Bar: 7.93 mm)
G) 2.0 mgl^{-1} BA +0.3 mgl^{-1} IBA (Bar: 7.61 mm)

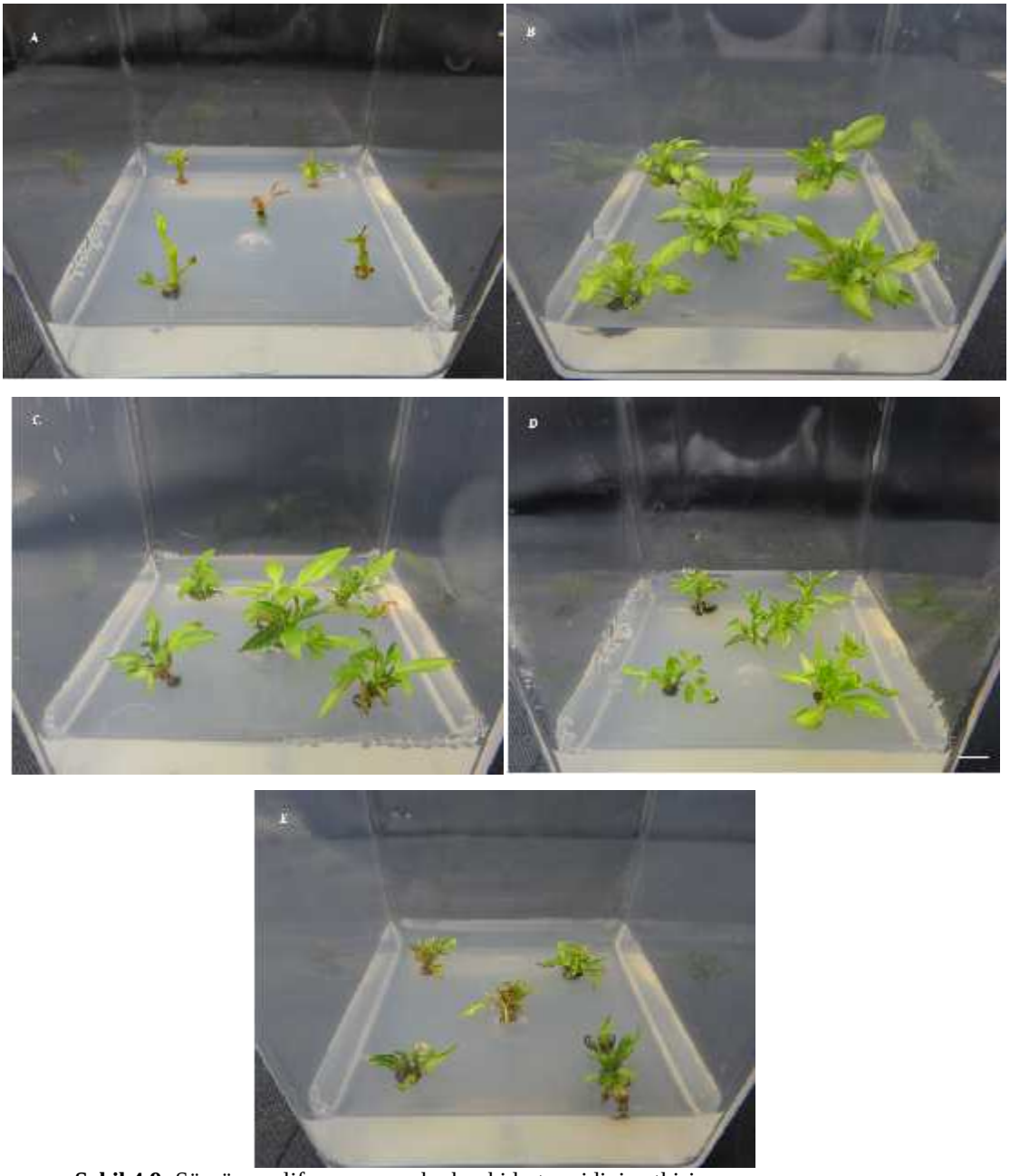
4.3.6. Sürgün Proliferasyonuna Karbonhidrat Tipinin Etkisi

Önceki deneyde en iyi sonucun 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA destekli MS besi ortamında olduğu gözlenmiştir. Bu deneyde karbonhidrat içermeyen 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA destekli MS besi ortamı kontrol gurubu olarak belirlendi ve farklı karbonhidrat (Sukroz, Glikoz, Fruktoz ve Maltoz) kaynaklarının sürgün proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Ortalama sürgün sayısı en yüksek 2.55 ile 30 g sukroz destekli ortamda, en düşük 1.45 ile karbonhidrat içermeyen kontrol gurubunda olduğu ortaya çıkmıştır. Ortalama sürgün sayısı glikoz, fruktoz ve maltozda bir birine yakın olduğu görülmüştür. Ortalama sürgün sayısı uygulama guruplarının tamamında kontrol gurubundan dikkat çekici bir şekilde yüksek değerler göstermiştir. Ortalama sürgün uzunluğu en yüksek 15.50 mm ile 30 g sukroz destekli ortamda, en düşük 10.95 mm ile karbonhidrat içermeyen kontrol gurubunda olduğu tespit edilmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından sukroz, glikoz, ve fruktozun istatiksel olarak pek fark göstermediği sonucuna varılmıştır. Kontrol gurubu dahil olmak üzere bütün eksplantların besi ortamıyla temas eden bazal kısımlarında kallus oluşmuştur ancak sukroz gurubunda en yüksek (%90) değer bulunurken en düşük değerinde kontrol (%25.60) gurubunda olduğu görülmüştür. Sukroz, fruktoz ve glikoz gurupları maltoz gurubundan daha yüksek oranda bir proliferasyon yüzdesi vermiştir. Fruktoz ve maltoz guruplarında eksplantlardaki kallus hacminin sukroz ve glikoz guruplarına göre daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu deney setinde en iyi sonucun 30 g sukroz destekli 2 mgl^{-1} BA+0.1 mgl^{-1} IBA MS besi ortamında olduğu açığa çıkmıştır.

Çizelge 4.12. Sürgün proliferasyonuna karbonhidrat çeşidinin etkisi

Karbohidrat Çeşidi (30 g)	Prolifere Olan Eksplant (%)	Kallus Olşturan Eksplant (%)	Ortalama Sürgün Sayısı ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH
Kontrol	25.40 c	25.60 c	1.45. ± 0.11 c	10.95 ± 0.47 c
Sukroz	85.75 a	90.10 a	2.55 ± 0.05 a	15.50 ± 0.18 a
Glikoz	85.90 a	85.95 a	2.05 ± 0.11 b	15.30 ± 0.10 a
Fruktoz	80.90 a	80.25 b	2.05 ± 0.04 b	15.40 ± 0.13 a
Maltoz	75.45 b	75.40 b	1.80 ± 0.51b	12.55 ± 0.14 b
X^2(df 4)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.9. Sürgün proliferasyonuna karbonhidrat çeşidinin etkisi
A) Kontrol (Bar: 9.52 mm)
B) Sukroz (Bar: 9.68 mm)
C) Glukoz (Bar: 10.09 mm)
D) Fruktoz (Bar: 9.52 mm)
E) Maltoz (Bar: 9.04 mm)

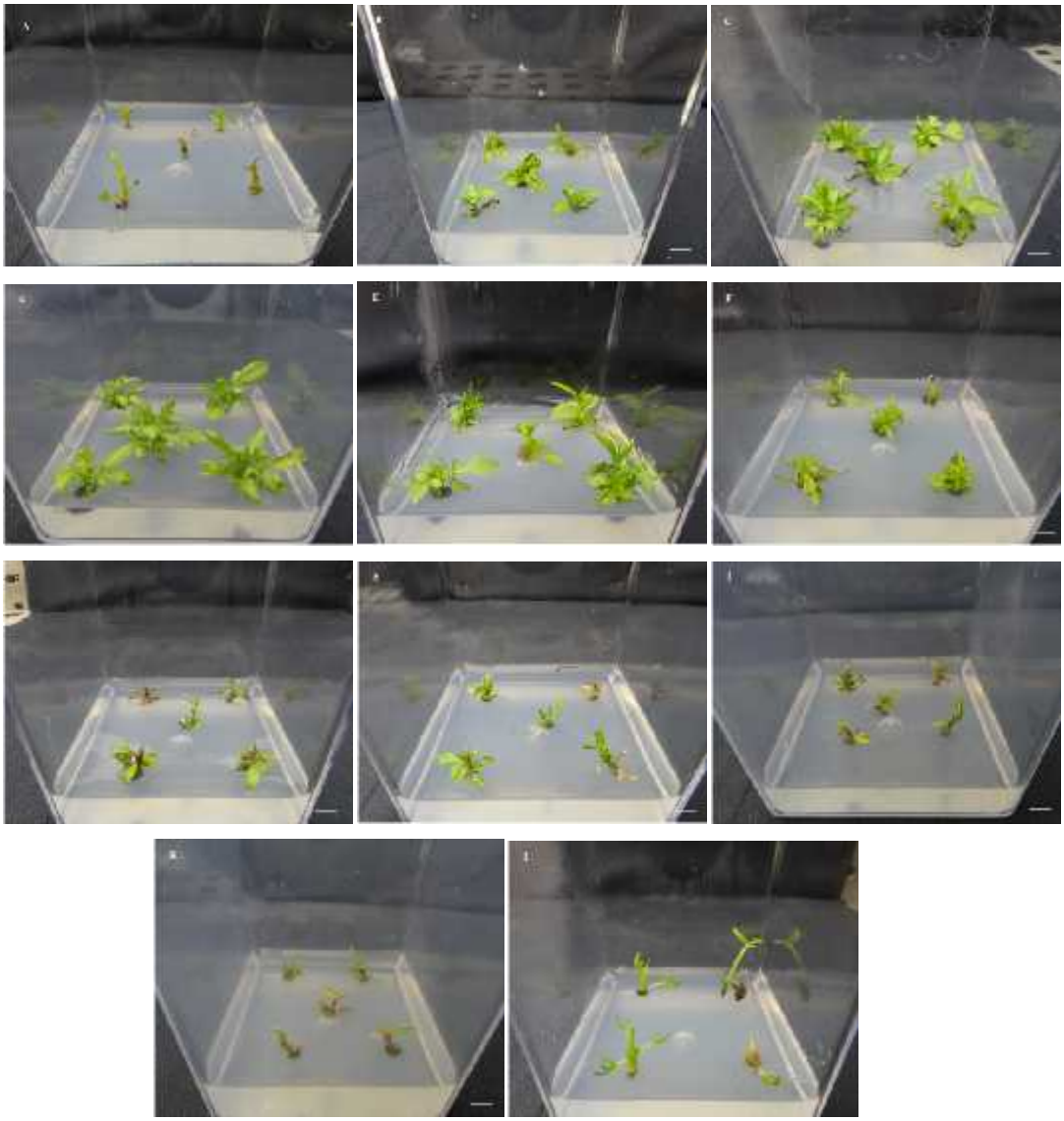
4.3.7. Sürgün Proliferasyonuna Sukrozun Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deney setinde, daha önceki deneysel çalışmada ortaya çıkan optimum koşulların 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA destekli MS kontrol gurubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.13 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Ortalama sürgün sayısının en yüksek 2.55 değeri ile 30 g sukroz destekli 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA MS ortamında, en düşük 1.10 değeri ile 100 g sukroz destekli 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA MS ortamında olduğu tespit edilmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu en yüksek 16.40 mm ile 10 g sukroz destekli 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA MS ortamında, en düşük 10.05 mm ile 100 g sukroz destekli 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA MS ortamında olduğu ortaya çıkmıştır. Eksplantların besi ortamıyla temas eden bazal kısımlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesinin ve prolifere olan ekplant yüzdesinin %1-3 konsantrasyonlarında artış gösterdiği fakat %4-10 arasındaki konsantrasyonlarda azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek, kallus oluşturan eksplant yüzdesi (%90) ve prolifere olan eksplant yüzdesi (%85) değerleri %3'lük sukroz konsantrasyonunda olduğu saptanmıştır. %3'ten yüksek sukroz konsantrasyonunun eksplant yapraklarında hacimce küçülmeye ve yapraklarda sararma ve kurumaya neden olduğu tespit edilmiştir. Eksplantlardaki kallus hacmi, %5-10 arasındaki konsantasyonlarda azalmış ve %6-8 konsantrasyonlarında kontrol gurubundan az bir farkla daha fazla olduğu görülmüştür. Sukroz konsantrasyonunda %3 ten sonraki konsantrasyonların eksplant büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediği saptanmıştır. Bu deneysel çalışma sonucunda en iyi sonucun 30 g sukroz destekli 2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA MS ortamında olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.13. Sürgün proliferasyonuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi

Sukroz (%)	Prolifere Olan Eksplant (%)	Kallus Olşturan Eksplant (%)	Ortalama Sürgün Sayısı ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) ± SH
Kontrol	25.40 e	25.60 c	1.45. ± 0.11 c	10.95 ± 0.47 e
1	65. 60 b	70.20 c	1.60 ± 0.11d	16.40 ± 0.16 a
2	80.00 a	80.80 b	2.20 ± 0.05 b	16.05 ± 0,11 a
3	85.75 a	90.10 a	2.55 ± 0.05 a	15.50 ± 0.22 b
4	75.90 b	75.40 b	2.25 ± 0.06 b	16.15 ± 0.13 a
5	50.90 c	60.10 c	2.05 ± 0.04 c	14.80 ± 0.11 c
6	45.85 c	60.55 c	1.45 ± 0.03 d	15.45 ± 0.09 b
7	45.50 c	55.90 c	1.15 ± 0.02 e	14.95 ± 0.05 c
8	45.20 c	50.20 d	1.15 ± 0.02 e	11.10 ± 0.09 e
9	40.15 d	55.60 c	1.20 ± 0.02 e	10.80 ± 0.10 e
10	45.95 c	50.80 d	1.10 ± 0.02 e	10.05 ± 0.13 f
X^2(df 10)	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır.
Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu
Ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel veriler olarak farklı olduğunu gösterir



Şekil 4.10. Sürgünl proliferasyonnuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi
A) Kontrol (Bar: 9.52 mm)
B) %1 (Bar: 8.00)
C) %2 (Bar: 9.50 mm)
D) %3 (Bar: 9.50 mm)
E) %4 (Bar: 8.60 mm)
F) %5 (Bar: 9.40 mm)
G) %6 (Bar: 9.00)
H) %7 (Bar: 9.00)
İ) %8 (Bar: 8.00)
K) %9 (Bar:9.00 mm)
L) %10 (Bar: 9.40 mm).



Şekil 4.11. Sürgün proliferasyonu optimize edilmiş besi ortamı **(**2 mgI^{-1} BA+0.1 mgI^{-1} IBA, 7g agar 30 g sukroz ile destekli MS) koşullarında 40. gün (Bar: 9.8 mm)

4.4. Sürgünleri Köklendirme Çalışmaları

Köklendirme çalışmalarında onsekiz defa alt kültürü yapılan sürgünler kullanıldı. Köklendirme çalışmalarında, sürgünlerin köklenmelerine farklı oksin tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) etkisi, uygun oksinin farklı konsantrasyonlarının (1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 mgl^{-1}) etkisi, sürgünlerin köklenmesi üzerine karanlık uygulamalarının etkisi ve sürgünlerin köklenmesi üzerine sürgün uzunluğunun etkisi deneyleri yapılmıştır.

4.4.1. Sürgünlerin Köklenmesine Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

Yirmisekiz günlük kültür süresi boyunca *in vitro* çoğaltılan eksplantların *in vitro* köklenmesi üzerine etkisi araştırılan bitki büyüme düzenleyicileri (IAA, IBA, NAA, 2,4-D), kontrol gurubu ile beraber test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12' de rapor edilmiştir. Köklenen eksplantlarda kök uçları 14. günde görülmeye başlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamları kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında en belirgin farkın eksplantın besi ortamı ile temas eden bazal kısımlarında kallusun oluşması ve bu kallustan kök oluşması olmuştur. Kontrol gurubunda her ne kadar kallus oluşumu, köklenme ve proliferasyon olmasa da yirmisekiz günlük kültürün sonunda eksplantlar yaşamaya devam etmiştir. Sürgün ucu nekrozu ve yapraklarda kuruma kontrol gurubundaki eksplantlarda uygulama guruplarına göre daha yüksek değerlerde görülmüştür. Uygulama guruplarında köklenmeyen eksplantların bazıları tamamen kurumuş ve eksplantlar ölmüştür. Köklenmeyip yaşayan eksplantlarda yaprak orta damarında kızıllık ve yapraklarda nekrozlu noktalar kontrol gurubuna göre daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Köklenen eksplantlarda apikal tomurcuk pulları 14. gün gözleminde kurumuş görülürken 28. gün gözleminde apikal tomurcuklarda kuruyan pulların yerini canlı kızıl renkli pullar almıştır. Kallus hacmi en fazla olan eksplantlar sırasıyla 1 mgl^{-1} NAA, IAA, IBA, 2,4-D içeren besi ortamlarındaki eksplantlarda olmuştur. NAA uygulama gurubunda köklenme yüzdesi %70 ile en yüksek değerde görülmüş, 2,4-D ve kontrol gurubunda köklenme görülmemiştir. Ancak, kontrol gurubu ile 2,4-D karşılaştırıldığında 2,4-D içeren besi ortamında kallus oluşturan eksplantlarda kök primordiyumu olduğu tahmin edilen taslaklar tespit edilmiş ve bu taslakların daha uzun bir kültür süresi sonunda (45 gün) çok zayıf kök uçlarına dönüştüğü tespit edilmiştir. Eksplant başına düşen kök sayısına bakıldığında 4.80 değeri ile NAA gurubunda, kök uzunluğuna bakıldığında 125.00 mm ile IBA uygulamasında görülmüş ise de kök çapının çok küçük olduğu görülmüştür (Şekil 4.12). Prolifere olan eksplant yüzdesine bakıldığında en yüksek değerin NAA uygulama gurubunda %10 olduğu görülmüş ve diğer uygulama guruplarında %5 değeri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Sürgünlerin köklenmesine farklı oksin tiplerinin etkisi

Oksin Tipi ($1\ mgl^{-1}$)	Prolifere Olan Eksplant (%)	Kallus Oluşturan Eksplant (%)	Köklenen Eksplant (%)	Eksplant Başına Düşen Kök Sayısı ±SH	Ortalama Kök Uzunluğu (mm) ±SH
Kontrol	0.00 c	0.00. d	0.00 d	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
IAA	5.10 b	55.80 b	25.70 b	1.60 ± 0.07 b	64.00 ± 9.93 b
IBA	5.70 b	60.90 b	10.40 c	1.50 ± 0.06 b	125.00 ± 7.16 a
NAA	10.90 a	100.00 a	70.10 a	4.80 ± 0.33 a	15.15 ± 1.27 c
2,4-D	5.40 b	50.30 c	0.00 d	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
X^2(df 4)	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05		

Veriler kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P < 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.12. Çeşitli oksin tiplerinde geliştirilen bitkiler (40 günlük kültür sonrasındaki görünüşleri) (bar: 21 mm).

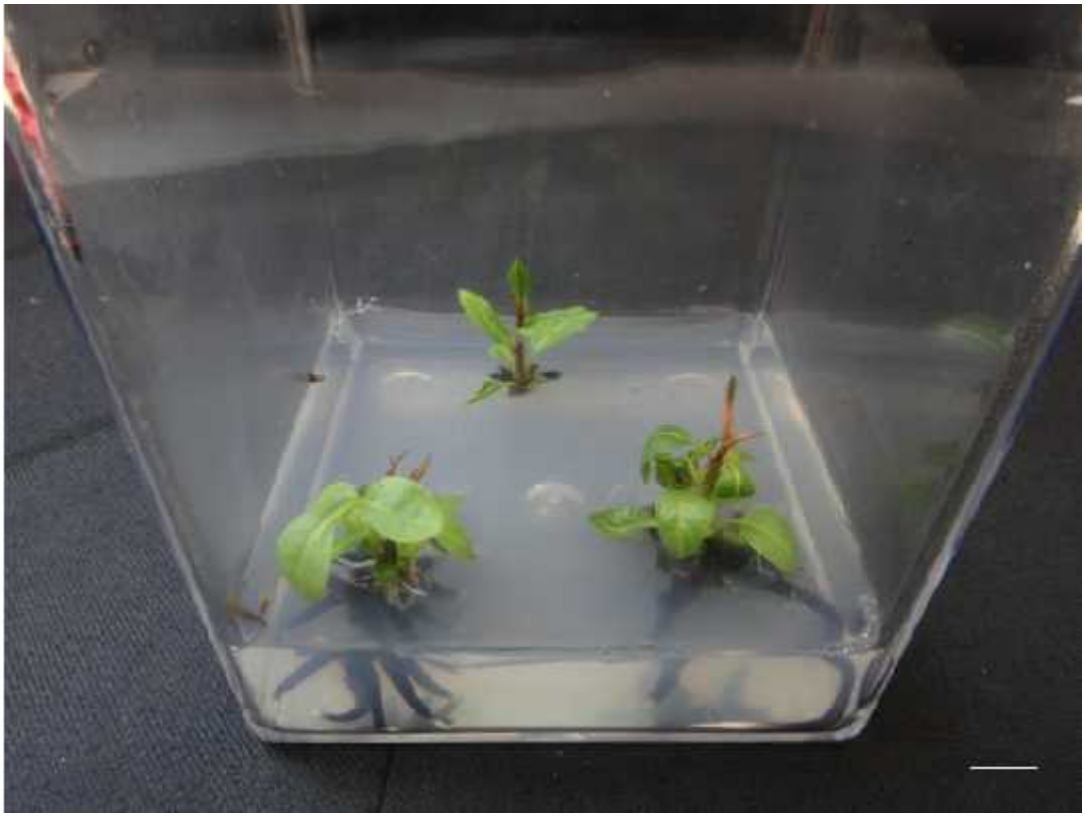
4.4.2. Sürgünlerin Köklenmesine NAA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Köklenme üzerine oksinlerin etkisinin araştırıldığı bir önceki deney iki tekrarlı ve her defasında 20 eksplant kullanılarak yapılmış ve en iyi oksin çeşidinin NAA olduğu tespit edilmiştir. Bu deney setinde NAA'nın 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 mgl^{-1} konsantrasyon etkileri araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. NAA konsantrasyonu artışının proliferasyon yüzdesini ve oluşan kallus hacmini artırdığı tespit edilmiştir. Kontrol gurubu dışındaki bütün uygulama guruplarında %100 kallus oluşmuştur ve 4, 6, 8, 10 mgl^{-1} uygulamalarında kallus hacminin 1, 2, 3 mgl^{-1} uygulamalarından çok daha fazla olduğu görülmüştür. 4, 6, 8, 10 mgl^{-1} uygulamalarının kalluslarından daha çok sayıda yeni sürgünlerin oluştuğu tespit edilmiş ve kallustan oluşan bu sürgünler kendine ait yeni kallus oluşturmuştur. Bu sürgünlerin oluşturduğu kallusun bazılarından zayıf tek kök oluşmuştur. Ayrıca, 4, 6, 8, 10 mgl^{-1} uygulamalarının oluşturduğu kallustan oluşan yeni sürgünlerin besi ortamına temas eden bazı yapraklarının üst epidermisinde adventif organojenezle çok zayıf olan kökler oluştuğu gözlenmiş ancak bu kökler yeteri kadar büyüp gelişememiş ve kendine ait sürgün sistemini oluşturamadan kurumuştur. Buna ek olarak büyüyen kallus hacminde kallusun besi ortamından uzak olan üst yüzeyinde sürgün gövdesinin altından kök oluşmuş ve bu kökler besi ortamıyla temas edemediği için kurumuştur. 2 mgl^{-1} uygulamasından sonraki yüksek konsantrasyonlu uygulamaların kök oluşturma yüzdesinin bir birine yakın olduğu tespit edilmiştir ve bu deneyde 3, 4, 6, 8, 10 mgl^{-1} den sonraki konsantrasyonların köklenme üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. 8, 10 mgl^{-1} uygulamasındaki köklerin çapı ve kök uzunluğu diğer uygulamalarla karşılaştırıldığında daha zayıf olduğu görülmüştür. Yapılan bu deney setinde 1 mgl^{-1} NAA uygulamasında en iyi sonuçlar elde edilmiş ve köklenme oranı %70, eksplant başına düşen kök sayısı 4.80 ve ortalama kök uzunluğu 15.15 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.15. Sürgünlerin köklenmesine NAA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

NAA Konsantrasyonu (mgl^{-1})	Prolifere Olan Eksplant (%)	Kallus Oluşturan Eksplant (%)	Köklenen eksplant (%)	Eksplant Başına Düşen Kök Sayısı ±SH	Ortalama Kök Uzunluğu (mm) ±SH
Kontrol	0.00 e	0.00 a	0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 h
1.0	10.90 d	100.00 a	70.10 a	4.80 ± 0.33 a	15.15 ± 1.27 a
2.0	20.80 c	100.00 a	40.55 b	2.50 ± 0.32 b	8.00 ± 0.60 d
3.0	45.00 b	100.00 a	35.90 b	1.40 ± 0.07 c	10.00 ± 0.62 c
4.0	55.50 a	10000 a	30.70 c	5.00 ± 0.33 c	11.00 ± 0.47 b
6.0	25.00 c	100.00 a	30.40 c	1.50 ± 0.07 c	6.50 ± 0.13 e
8.0	60.90 a	100.00 a	35.45 c	2.10 ± 0.13 b	5.50 ± 0.13 f
10.0	40.10 b	100.00 a	30.60 c	1.00 ± 0.00 c	3.40 ± 0.04 g
X^2(df 7)	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre $P < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.13. 1 mgl^{-1} NAA içeren besi ortamındakültüre alındıktan 28 gün sonra sürgünlerden gelişen köklenmiş bitkiler (Bar: 14.28 mm)

4.4.3. Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi

Sürgün uzunluğunun köklenme üzerine etkilerinin araştırıldığı bu deney setinde NAA'nın 1 mgl^{-1} konsantrasyonu kullanılarak sonuçlar Çizelge 4.16 ve Şekil 4.14' te verilmiştir. Uygulama guruplarının tamamında %100 kallus oluşumu görülmüşsede proliferasyon yüzdeleri çok düşük ve birbirine yakın değerlerde ortaya çıkmıştır. Köklenme yüzdesi en yüksek (%85) olan gurubun 1 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantlar olduğu görülmüştür. Fakat, 1 cm'lik uygulama gurubunda ortalama kök uzunluğunun en düşük (11.20 mm) değerde olduğu, ayrıca kök çaplarının diğer uygulama guruplarına göre daha küçük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Eksplant başına düşen kök sayısı en yüksek 4.70 değeri ile 1 cm'lik uygulama gurubunda tespit edilmiş ve diğer gurupların birbirine yakın değerde olduğu ortaya çıkmıştır. Morfolojik olarak, yaprakta pigment değişimi sonucu sararma, yaprak kenarları ve apeksinde kuruma ve kıvrılma, tepe tomurcuğu sürgün pullarında kuruma, sürgün uzunluğunun artışıyla azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Sürgünlerin köklenmesine uzunluğun etkisi

Sürgün Uzunluğu (cm)	Prolifere Olan Eksplant (%)	Kallus Oluşturan Eksplant (%)	Köklenme Oranı (%)	Eksplant Başına Düşen Kök Sayısı ±SH	Ortalama Kök Uzunluğu (mm) ±SH
1	5.70 b	100.00 a	85.30 a	4.70 ± 0.53 a	11.20 ± 2.06 b
2	5.10 b	100.00 a	60.30 b	2.50 ± 0.21 b	25.60 ± 1.26 a
3	10.70 a	100.00 a	65.70 c	2.80 ± 0.16 b	23.50 ± 1.30 a
4	5.00 b	100.00a	65.00 c	2.70 ± 0.10 b	23.60 ± 0.55 a
X^2(df3)	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05		

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P < 0.05seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.14. Sürgünlerin köklenmesine sürgün uzunluğunun etkisi (Bar: 15.20 mm)

4.5. Aklimatizasyon Çalışmaları

In vitro köklenen fidelerin doğal ortama alıştırılması sıcaklık, ışık ve nem kontrollü iklimlendirme kabininde yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Adaptasyon çalışmaları iki kademede gerçekleştirilmiştir: ilk aşamada *in vitro* köklendirilmiş sürgünleri besi ortamı kalıntılarından arındırmak için akan musluk suyunda bir gece bekletme, ikinci aşamada bitkicikler ¼ oranında seyreltilmiş MS çözeltisi ile zenginleştirilmiş tam steril torf bulunan saksılara aktarılmış ve 2-3 hafta boyunca 20 °C, yüksek nem (%95) düşük ışık (PPF= 55 µmol m^{-2} s^{-1}) yoğunluklu ortamda bekletildikten sonra, kademeli olarak nemlilik oranının azaltıldığı ve ışık oranının arttırıldığı iklimlendirme kabinine alınmıştır. Toplam 6-7 hafta sonunda bitkicikler 24±2 °C sıcaklığın olduğu bir bitki büyütme odasına (maksimum nem %50-60 ve maksimum PPF =55 µmol m^{-2} s^{-1}) transfer edildikten sonra adaptasyon tamamlanmıştır.

4.5.1 Aklimatizasyon Çalışmalarına Torfun Etkisi

Rejenere olan bitkiciklerin bulunduğu ortam, steril, yüksek nem içeren ve ihtiyaç duyulan tüm besinleri içeren bir ortamdır. Bitkiciklerin steril olmayan, daha düşük nem ve daha az besin elementi içeren bir ortama aktarılması ve bu ortamda yaşamlarını devam ettirmelerinde bir çok faktörün önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu faktörler; 1- Rejenerantlar kültür kaplarında iken; rejenerantların taşıdığı yaprak sayısı, köklerin sayısı çapı ve boy uzunluğu ve besi ortamında iken kültür kabı kapaklarının uygun sürelerde önce aralanması sonra tam açılması, 2- Besi ortamı maddelerinden arındırma işleminde; bitkicik yaprak gövde ve köklerinde agarlı besi ortamı madde kalıntılarının iyi temizlenmesi, 3- Saksılara aktarma işleminde; kök apikal meristeminde, gövde ve yaprak kısımlarında meydana gelen yaralanma ve hasarlar, bitkicikler saksılarda iken nemin ayarlanması ve sulama periyodudur.

Kısa gövdeli bitkiciklerin, uzun gövdeli bitkiciklere göre daha az bir oranda aklimatize olduğu tespit edilmiştir. Saksılara aktarılan bitkiciklerde mantar kontaminasyonu yok ise, apikal sürgün pullarının ve yaprakların kuruması durumunda bile bitkiciklerin yeni sürgün ve yaprak oluşturarak yaşamına devam ettiği görülmüştür.

Saksılara aktarılan bitkiciklerde değişen nem oranını ayarlamak için bitkiciklerin üzerinin ışık geçiren cam beherlerle uzun süre kapalı tutulması kontaminasyon oranını artırdığı tespit edilmiştir. Aklimatizasyon çalışmalarında kök, gövde ve yaprağı zarar görmeden tam steril torf içeren saksılara aktarılan bitkiciklerin ilk 14-21-28. günde sırasıyla %85, %65, %60'nın ve 90. günde %30'nun yaşamını devam ettirdiği görülmüştür. Ölen bitkiciklerde mantar kontaminasyonu gövde ve yapraklarda görülürken, torf içindeki kökleri çıkarılıp incelendiğinde mantar misellerinin kök etrafını sardığı görülmüştür. Kontaminasyonun engellenebilmesi durumunda yaşamını devam ettirecek bitkicik sayısının artması beklenen durumdur.

Çizelge 4.17. Bitkilerin aklimatizasyonuna torfun etkisi

Torf Tipi	28. Günde Yaşayan Rejenerant (%)	90. Günde Yaşayan Rejenerant (%)
Tam steril	60.0 a	30.0 a
Yarı steril	40.0 b	20.0 b
Steril olmayan	20.0 c	0.0 c
χ2 (df 2)	P < 0,05	P < 0,05

Sonuçlar aklimatizasyonun 28. ve 90. gününde 20 bitkiciğin yüzdesini gösterir



Şekil 4.15. Nem kontrolü sağlanmaya çalışılan bitki



Şekil 4.16. Saksıya aktarılmış bitki (50. gün)

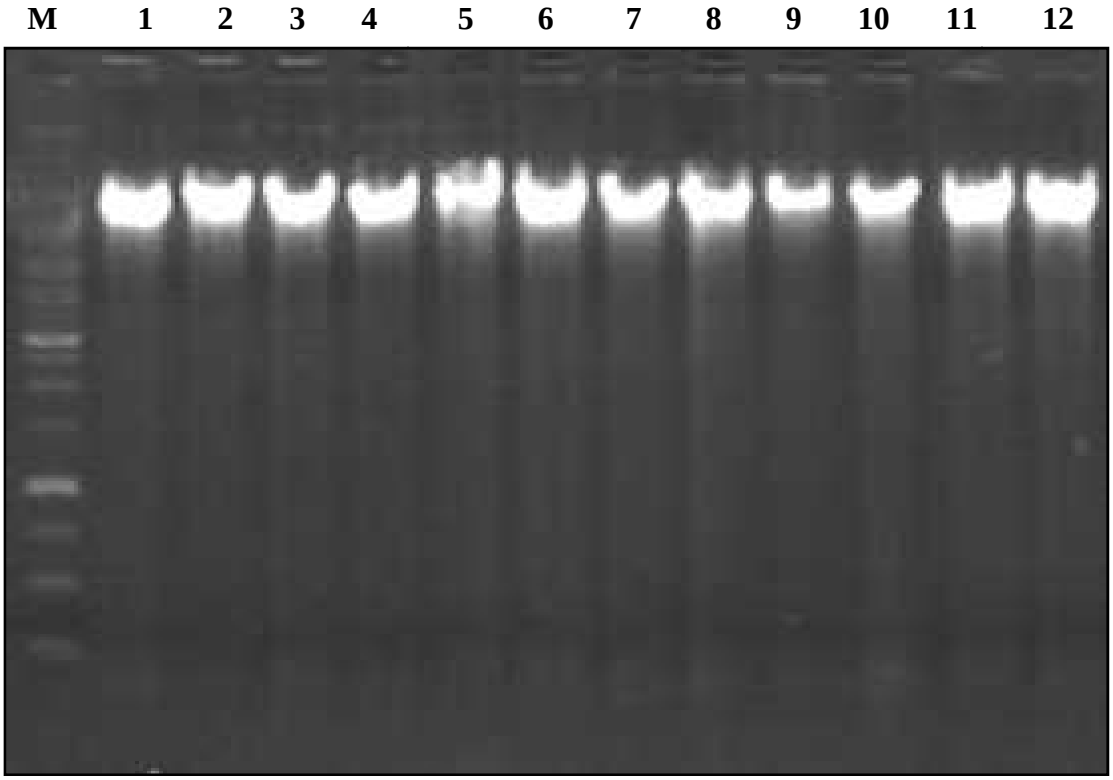
4.6. Somaklonal Varyasyon Çalışmaları

Ana materyal ve klonlara ait yaprak örneklerinin genomik DNA (gDNA) izolasyonu sonrası DNA miktarları, Qubit®2.0 florometre cihazı kullanılarak A260/A280 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak, örneklere ait gDNA miktarları belirlendi (Çizelge 4.18) ve DNA belirteci ile birlikte DNA izolasyonu sonrasında, örnekler görüntülenmek üzere % 0,8'lik agaroz jele yüklendi (Şekil 4.17).

Çizelge 4.18. Çalışmada kullanılan örnekler ve genomik DNA izolasyonu sonucu elde edilen konsantrasyon sonuçları

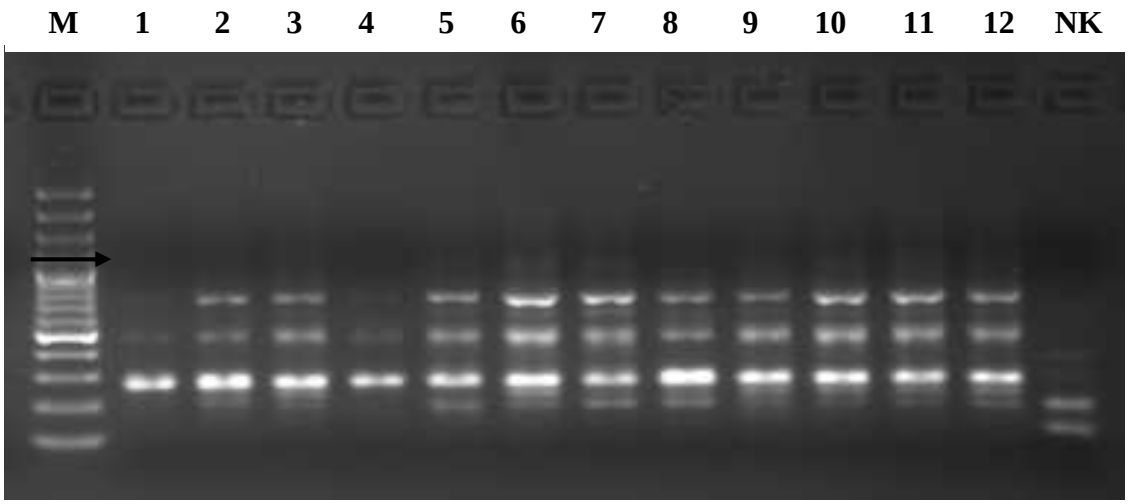
No	Örnek Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)
1	Ağaç 1	6.51
2	Ağaç 2	24.50
3	Ağaç 1-5. Kültür	5.88
4	Ağaç 1-10. Kültür	4.84
5	Ağaç 1-15. Kültür	3.56

6	Ağaç 1-20. Alt Kültür	37.10
7	Ağaç 1-24. Alt Kültür	194.00
8	Ağaç 2-5. Kültür	4.42
9	Ağaç 2-10. Kültür	4.82
10	Ağaç 2-15. Kültür	12.40
11	Ağaç 2-20. Alt Kültür	78.30
12	Ağaç 2-24. Alt Kültür	49.60

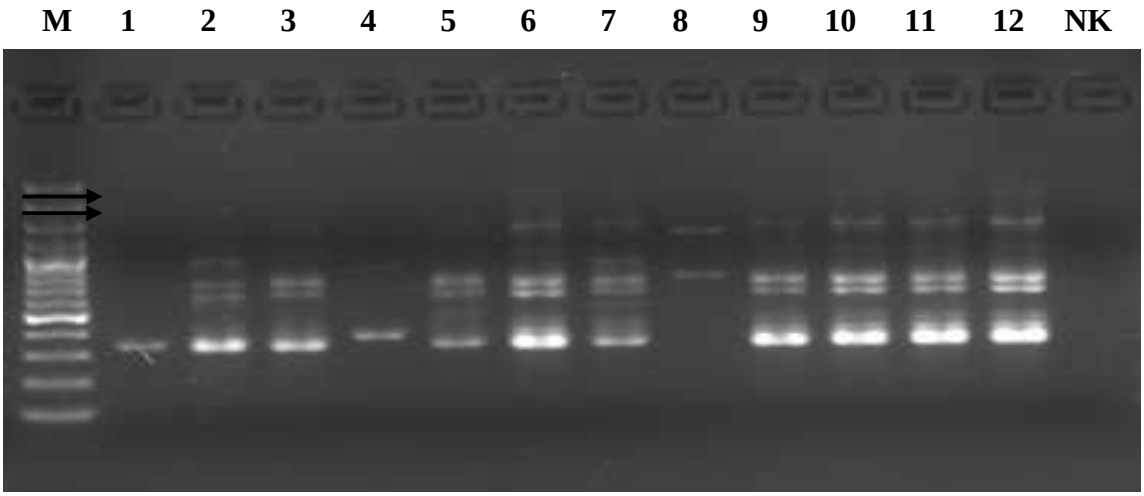


Şekil 4.17. Dişi *P. khinjuk* ağacı kültürlerine ait genomik DNA örnekleri; **M:** 1 Kb DNA Ladder, **1:** Ağaç 1, **2:** Ağaç 2, **3:** Ağaç 1-5. Kültür, **4:** Ağaç 1-10. Kültür, **5:** Ağaç 1-15. Kültür, **6:** Ağaç 1-20. Alt Kültür, **7:** Ağaç 1-24. Alt Kültür, **8:** Ağaç 2-5. Kültür, **9:** Ağaç 2-10. Kültür, **10:** Ağaç 2-15. Kültür, Ağaç 2-20. Alt Kültür, **12:** Ağaç 2-24. Alt Kültür.

P. khinjuk çeşidine ait ana bitkiler ve klonlarına ait genomik DNA'ların, mikroçoğaltım süresince oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesinde kalıp olarak kullanıldığı ISSR-PCR reaksiyonlarında toplamda 20 ISSR primeri ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen agaroz jel görüntülerinden iki tanesi Şekil 4.18 ve 4.19 da sunulmuştur. Her bir primer ile elde edilen ve ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayıldı.



Şekil 4.18. UBC 857 ISSR primeri ile 12 Dişi *P. khinjuk* ağacı örneği kullanılarak yapılan PZR ile çoğaltım sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü; **M:**100 bç DNA ladder, **1:** Ağaç 1, **2:** Ağaç 2, **3:** Ağaç 1-5. Kültür, **4:** Ağaç 1-10. Kültür, **5:** Ağaç 1-15. Kültür, **6:** Ağaç 1-20. Alt Kültür, **7:** Ağaç 1-24. Alt Kültür, **8:** Ağaç 2-5. Kültür, **9:** Ağaç 2-10. Kültür, **10:** Ağaç 2-15. Kültür, **11:** Ağaç 2-20. Alt Kültür, **12:** Ağaç 2-24. Alt Kültür, **NK:**Negatif Kontrol. Oklar Polimorfik bantların bir kısmını göstermektedir



Şekil 4.19. UBC 847 ISSR primeri ile 12 Dişi *P. khinjuk* ağacı örneği kullanılarak yapılan PZR ile çoğaltım sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü; **M:**100 bç DNA ladder, **1:** Ağaç 1, **2:** Ağaç 2, **3:** Ağaç 1-5. Kültür, **4:** Ağaç 1-10. Kültür, **5:** Ağaç 1-15. Kültür, **6:** Ağaç 1-20. Alt Kültür, **7:** Ağaç 1-24. Alt Kültür, **8:** Ağaç 2-5. Kültür, **9:** Ağaç 2-10. Kültür, **10:** Ağaç 2-15. Kültür, **11:** Ağaç 2-20. Alt Kültür, **12:** Ağaç 2-24. Alt Kültür, **NK:**Negatif Kontrol. Oklar polimorfik bantların bir kısmını göstermektedir

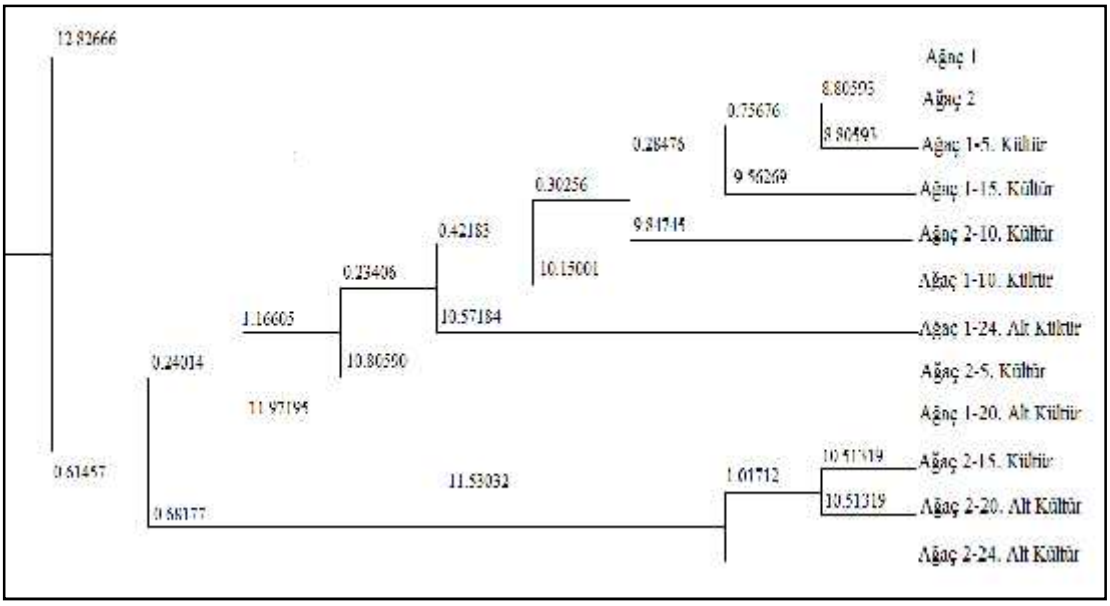
Çizelge 4.19. Örnekler arasında "PopGene32" programı kullanılarak elde edilen genetik benzerlik değerleri (Nei, 1978)

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	****	0.7956	0.7852	0.7822	0.7837	0.7481	0.7748	0.7822	0.7852	0.7659	0.7541	0.7556	
2		****	0.8385	0.8178	0.8281	0.7926	0.8074	0.8059	0.8207	0.7956	0.7837	0.7822	
3			****	0.8222	0.8237	0.7911	0.8089	0.8044	0.8193	0.7852	0.7733	0.7748	
4				****	0.8178	0.7793	0.7941	0.7926	0.8074	0.7793	0.7704	0.7748	
5					****	0.7807	0.8252	0.8030	0.8237	0.7837	0.7748	0.7763	
6						****	0.7896	0.7822	0.7941	0.7867	0.7511	0.7496	
7							****	0.8089	0.8119	0.7956	0.7926	0.7704	
8								****	0.8193	0.8000	0.7911	0.7837	
9									****	0.8178	0.8148	0.7956	
10										****	0.8104	0.8000	
11											****	0.7881	
12												****	

Kullanılan 20 çeşit primere göre oluşan bant sayısı kullanılarak meydana gelen genetik benzerlik Çizelge 4.19 ve Şekil 4.20' de verilen dendogramda sunulmuştur. Benzerlik matriksi incelendiğinde ana materyal ile klonlar arasındaki en yakın benzerlik 0.8385 ile Ağaç-2 ile Ağaç-1' in 5. Alt kültürüne ait klon olup, en uzak benzerlik

0.7481 ile Ağaç-1 ile Ağaç-1’ in 20. Alt kültürüne ait klondur. Benzerlik matriksinde ortalama benzerlik 0.7928’ dir.

Dendogram incelendiğinde, Ağaç-1 ile Ağaç-2 ve klonlar birbirinden tamamen ayrı kollarda bulunmaktadır. Ağaç-1’ de alt kültür sayısı artıkça benzerliğin azaldığı görülmektedir. Ağaç-1’e en yakın klonun 5. Alt kültürde olan klonların olduğu görülmektedir. Ağaç-2’ye bakıldığında 15. 20. ve 24. Alt kültürlerde klonların benzerlik oranlarında azalmanın başladığı görülmüştür. Ağaç-1’ in klonları, genetik olarak ileri süreçteki alt kültürlemelerde görüldüğü üzere Ağaç 2’ ye daha yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan çeşitlerinin birbirine olan yakınlığını ve uzaklığını gösteren dendogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antepfıstığı İran Türkiye ve Suriye'nin kurak ve yarı kurak bölgelerinde yaşayan insanların tarımsal ekonomilerinde önemli bir yere sahiptir (Padulosi ve ark. 1996). Antepfıstığının doğal bir anacı olan *P. khinjuk*'un (buttum) geleneksel olarak tohumdan çoğaltılması, hem istenmeyen anaç özelliklerinin ortaya çıkması, hem de uzun bir zamana, geniş alanlara ve büyük bir iş gücüne ihtiyaç duyması bakımından çok fazla tercih edilmez. Bunun tersine *in vitro* çoğaltım, istenilen özelliklere sahip bir anaçtan aynı genotipe sahip bitkilerin elde edilmesi, zaman, alan ve iş gücü tasarrufu bakımından önemli avantajlar sağlar. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak *in vitro* çoğaltımı yapılan olgun dişi buttum ağacından anaç üretimi yeni fıstık bahçelerinin kurulmasına önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Olgun dişi buttum ağacı için optimize edilmiş *in vitro* mikro çoğaltım koşullarının değerlendirilmesi ve tartışılması ile somaklonal varyasyon analizler aşağıdaki başlıklar altında ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

- Materyalin Dezenfeksiyonu
- Kültür Başlatılması
- Sürgün Proliferasyonu
- Köklendirme Çalışmaları
- Aklimatizasyon ve Bahçe Şartlarına Aktarım Çalışmaları
- Somaklonal Varyasyon Analizi

5.1. Materyalin Yüzey Dezenfeksiyonu

Yüzey dezenfeksiyonu doku kültürü işlemleri arasında en önemli aşamalardan biridir ve yüzey dezenfeksiyonunda en fazla kullanılan maddeler etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksittir (Babaoğlu ve ark. 2002).

Pistacia cinsinin bir çok türünde farklı eksplant çeşitleri (tohum yada apikal ve lateral yomurcuklar) ticari (Axion, Domestos,) sodyum hipoklorit ile başarılı bir şekilde dezenfekte edilmiştir.

Barghchi (1982), olgun Antepfıstığı tohumlarından yetiştirilen fidelerin yüzey dezenfeksiyonunun %70'lik etanolde 45 saniye bir ön çalkalama işlemden sonra %20'lik NaOCl'de 25 dakika çalkalama ile başarıldığını rapor etmiştir.

Otuz yaşındaki antepfıstığı ağaçlarından alınan ve aktif olarak büyüyen sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunun, % 20'lik cholorox ile 20 dakika çalkalama ve daha sonrasında ise 3 defa steril saf su ile çalkalama işlemi ile başarıldığını bildirmiştir (Abousalim 1990).

Onay (2000), olgun antepfıstığı dişi ağaçlarından alınan sürgün uçlarını saf alkolde 2 dakika çalkalama işleminden sonra %20'lik NaOCl'de 10-30 dakika çalkalayarak dezenfekte edilebildiğini bildirmiştir.

P. khinjuk'un olgun tohumları %20'lik NaOCl'de 30 dakika çalkalanarak dezenfekte edildiği rapor edilmiştir (Tilkat 2005).

P. khinjuk, P.terebinthus, P. atlantica, ve *P.mutica* tohumlarında %70 etanolde 5 dakika çalkalamadan sonra 1 defa steril saf suda yıkama işlemine ek olarak %15'lik ticari NaOCl'de 15 dakika çalkalama ve steril saf su ile 1 defa yıkama, son olarak tekrara %70'lik etanolde 2 dakika çalkalanıp 3 defa steril saf su ile yıkanması durumunda başarılı bir dezenfeksiyonun elde edildiği rapor edilmiştir (Can ve ark. 2006).

Serada büyütülen genç P. vera fidanlarından alınan sürgünler, 1 saat akan musluk suyu altında bekletildikten sonra sabunlu suyla 15 dakika çalkalanmıştır. Bu sürgünler %0.5'lik sistemik fungisit (benomil) bulunan bir ortamda 15 dakika çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra %70'lik etil alkol ve bir damla tween 20 bulan bir ortamda 1 dakika sonra %1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika çalkalanıp 3 defa steril saf su ile yıkandıktan sonra dezenfekte edilmiştir (Al-Safadi ve Elias 2010).

Erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan tomurcukların her hangi bir ön işleme maruz bırakılmadan %10'luk ticari NaOCl'te 20-45 dakika çalkalanarak etkili bir şekilde yüzey dezenfeksiyonunun yapıldığı rapor edilmiştir (Tilkat ve ark. 2008).

Erkek *P. vera* ağaçlarının sürgün uçları 5-10 dakika çeşme suyu ile yıkandıktan sonra %702lik etil alkolde 30 saniye, %15'lik ticari NaOCl'de 40 dakika çalkalanarak dezenfekte edilmiştir (Ayaz-Tilkat ve ark. 2011).

P. vera tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi için yapılan yüzey dezenfeksiyonunda musluk suyu ile yüzeysel olarak yıkandıktan sonra %90'lık etil alkolde 1 dakika çalkalam ve ardından %1'lik civa klorürde ($HgCI_2$) 15 dakika çalkalanarak dezenfekte edilebileceği rapor edilmiştir (Hussaın 2012).

P. lentiscus tohumlarının ticari sodyum hipokloritte (Axion) 5 dakika çalkalanarak yüzey dezenfeksiyonunun gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Yıldırım 2012).

Bu çalışmada eksplant kaynağı olarak dişi buttum ağaçlarının (*P. khinjuk*) apikal ve lateral tomurcukları 40 saniye %70'lik etil alkolle yıkandıktan sonra ticari sodyum hiopoklorit (ACE) ile dezenfekte edilmeye çalışılmıştır. Kullanılan ticari sodyum hipokloritin aktif klor oranı yaklaşık olarak %5 civarında olduğu Türk Standartlar Enstitüsü (TSE) kayıtlarından tespit edilmiştir. Aktif klor oranı belli olan ticari sodyum hipokloritin %10'luk konsantrasyonunda 30 dakika çalkalanmayla eksplantların %32 oranıda kontamine olmadan kültür koşullarında yaşamaya devam ettiği ortaya konmuştur (Çizelge 4.1 ve 4.2). Sodyum hipokloritin artan konsantrasyonları dezenfekte eksplant oranını artırmış fakat canlı kalan ve süren eksplant sayısında azalmaya neden olmuş ve kahverengileşen eksplant yüzdesinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.1).

Eksplant yüzeyinde kalan dezenfektanın dezenfekte kaplarda, steril saf su ile çalkalanarak durulanması yıkama işlemidir. Yıkama işlemi üç engelle başa çıkılmasına olanak sağlamıştır; 1- klor eksplant yüzeyinden uzaklaştırılmış 2- apikal ve lateral tomurcuk pulları arasına sıkışmış olan bakteri ve mantar sporları gibi kontaminasyon etmenleri, çalkalama işleminin etkisiyle tomurcuk pulları arasından çıkarak eksplantları terk etmiş 3- mekanik yaralanma sonucu bitki dokusundan salınan fenolik bileşikler osmotik potansiyel etkisiyle steril saf suya geçmiştir. Saf suya geçen klor, kontaminasyon etmenleri ve fenolik bileşikler 10 dakikada bir değiştirilen dezenfekte erlen kapları ve steril saf su ile eksplantların bulunduğu kaptan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi süresinin 20-30 dakika olduğu denemelerde eksplantlarda tomurcuk pulları arasında mantar kaynaklı kontaminasyonun yüksek oranda görülmesi ve eksplantların kesilmiş kısımlarından besi ortamına temas eden bazal kısımlarında fenolik salınımı gözlenmesi yıkama işlemi süresini artırma ihtiyacını doğurmuştur. Yıkama süresinin artması (40-50 dakika) kontaminasyon oranını ve fenolik salınımını

azaltmıştır. Yıkama işleminin 60 dakika ve 90 dakika olarak test edilmesi arasında farklılık gözlenmediğinden 60 dakika olarak tespit edilmiştir. Kontrol gurubunda %100'lük bir kontaminasyonun olmaması 40 saniyelik etil alkole maruz kalma işlemi ve 60 dakika boyunca yapılan yıkama işlemine dayandırılmaktadır (Çizelge 4.1). Materyalin dezenfeksiyonu deneylerinde yıkama işleminin 60 dakika, dezenfektan konsantrasyonu %10 ve dezenfektanda çalkalama süresinin 20-30 dakika olması en etkili dezenfeksiyon sonuçlarını ortaya koymuştur.

Dezenfeksiyon çalışmalarında bulunan optimum sonuçlar kullanılarak yıl boyunca her ay alınan apikal tomurcuklardan aylara göre farklı değerlerde dezenfekte eksplantların elde edilmesi, buttum ağacının yaşadığı alanda mevsimsel olarak değişen fiziksel koşulların (sıcaklık ve nem) kontaminasyon etmenleri üzerinde etkili olduğu tahminini doğurmuştur.

5.2. Kültür Başlatılması

Bitki türlerinin klonal üretiminde kalluslar poliploit ve anöploit bitkiler meydana getirebildiğinden bazı çekinceler içerir fakat apikal ya da lateral tomurcukların kullanılması bu çekinceleri en aza indirmektedir. Apikal meristem hücrelerinin tek düze olması ve kültür koşulları altında genotipik değişikliklere çok az yatkın olmasından dolayı mikroçoğaltımda apikal ve lateral tomurcuklar kullanılır (Babaoğlu ve ark. 2002).

Olgun *P. vera* ve *P. atlantica* ağaçlarından alınan lateral eksplantların *in vitro* kültür başlatılmasına yanıt vermediği, fakat *P. vera*'ya GA_3 püskürtme, genç fideler üzerine aşılama gibi yöntemler uygulandığında meydana gelen sürgünlerin lateral tomurcuklarından *in vitro* kültürün başlatılabileceği bildirilmiştir (Bustamante-Garcia 1984).

Olgun antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantlardan *in vitro* kültür başlatılmasında eksplantların kültür kaplarında kahverengileşmesinin (eksplant ölümü) büyük bir engel olduğunu bildirmiştir (Barghchi 1986). Dört yaşına kadar serada büyütülmüş *P. vera* ağaçlarının kültür tiplerinden alınan eksplantlarda kültür başlatmada sık sık alt kültür yapılmasının kahverengileşme sorununa bir çözüm

getirdiği bildirilmiştir (Barghchi ve Martinelli 1984). Meyve veren ağaçlardan alınan eksplantların ise kültüre alınmasının kahverengileşme nedeniyle zor olduğu rapor edilmiştir (Barghchi 1985).

Yirmi beş yaşındaki antepfıstığı ağaçlarının ligninleşmiş sürgünlerinden alınan 3-4 cm'lik apikal ve lateral tomurcukların kesik uçları, BA çözeltisi içerisine birkaç dakika daldırıldıktan sonra sürgün gelişmesi için sera ortamında torf ve toprak içeren saksılara bırakılmıştır. Serada gelişmeye zorlanan apikal ve lateral uçlardan gelişen yeni sürgünlerin, *in vitro* kültür başlatılmasında kullanılacak en etkin eksplantlar olduğu rapor edilmiştir (Onay 2000).

Yaptığımız çalışmada kültür başlatılması için en uygun eksplant tipinin apikal tomurcuklar olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3)

Kültür başlatma çalışmalarında materyalin ana bitkiden alınma zamanı oldukça önemli bir parametre olarak literatürlerde değerlendirilmiştir.

Olgun antepfıstığı ağaçlarından kültür başlatılmasında eksplantın ağaçlardan alınış tarihinin önemi ile ilgili yapılan çalışmada sürgün uçlarından alınan çelik uzunluklarının ve sürgünlerin ağaçtan alınma zamanlarının kültür başlatılması üzerinde doğrudan etkileri olduğunu, sürgünlerin anaç ağaçtan alınma zamanının en iyi olduğu dönemin ise mart-mayıs ayları olduğunu tespit etmişlerdir (Onay ve ark. 2003).

Erkek antepfıstığı (*P. vera* cv. "atlı") ağaçlarının *in vıtro* mikroçoğaltılmasında mayıs ayında kültüre alınan apikal tomurcuklarda, yaşayan eksplant oranının %90'a çıktığı ve eylül ayına kadar aynı düzeyde devam ettiğini tespit edilmiştir (Tilkat ve ark. 2008).

Antepfıstığı anaçlarında sürgünlerde büyüme ve gelişmenin aktif olduğu iki dönem bulunmaktadır ve bu dönemler mart-nisan, haziran-temmuz dönemleri olarak tespit edilmiştir (Ayfer ve ark 1990). Yaptığımız çalışmada kültür başlatmaya yılın en uygun döneminin etkisi araştırılmış ve yaşayan ve süren eksplantların temmuz-ağustos aylarında daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6). Bu veri doğrultusunda bitkiden alınan apikal sürgünlerin *in vitro* koşullarda sürmesi apikal sürgünlerdeki fizyolojik durumla ilgili olduğu ve büyüme ve gelişmenin aktif olduğu dönemlerde

alınan eksplantların daha kullanışlı olacağı sonucuna varılmıştır. mart-nisan dönemindeki sürgünlerde kontaminasyon oranı yüksek olduğundan tercih edilmemesi gereken aktif dönem olarak tespit edilmiştir.

Kültür besin ortamı bileşenlerinin en önemli elemanlarından biri olan bitki büyüme düzenleyicileri kültür başlatılmasında birçok araştırıcı tarafından test edilmiştir. antepfıstığı ağaçlarında 1 mgl^{-1} BA (Onay 2000, Tilkat ve ark. 2008) kültür başlatılabileceği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada kültür başlatmak için test edilen BBD'lerden BA ve TDZ ölçülen parametreler açısından birbirine yakın değerlerde olduğu 2 $mg1^{-1}$ BA miktarının en etkili konsantrosyon olduğu 28 günlük kültür süresi sonunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.4 ve 4.5).

5.3. Sürgün Proliferasyonu

Sürgün proliferasyonu *in vitro*'da kısa sürede çok sayıda sürgün elde etme açısından oldukça önemlidir çünkü ancak var olan sürgünlerin köklendirilmesi ile bitkicik elde edilebilir ve rejenerasyon tamamlanmış olur. Sürgün çoğaltımında besi ortamı komponentlerinden en önemli olanlardan birisi kullanılan BBD çeşididir. *İn vitro* çoğaltımda en çok kullanılan sitokininler, benzil adenin (BA), izopentil adenin (2iP), Kinetin (K) ve Thidiazuran (TDZ)'dır (Babaoğlu ve ark. 2002).

Sürgün proliferasyonunda kullanılacak besi ortamı çeşidinin tespit edilmesinde farklı bitki türlerinde farklı besi ortamlarının daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Genellikle kullanılan besi ortamı çeşitleri şunlardır; MS, B5 (Gamborg ve ark. 1968), SH (Schenk *ve* Hildebrandt 1972), QL, WPM, Rugini ve Verma (Rugini ve Verma 1983), DKW'dir.

Antepfıstığı anaçlarının *in vitro* sürgün çoğaltımında genellikle MS besi ortamı kullanılmıştır. *P. vera* türünde (Barghchi 1982, Martinelli 1988, Abousalim 1990, Onay 2000, Tilkat ve ark. 2008, Ayaz-Tilkat ve ark. 2011) MS besi ortamını kullanırken, Al-safadi ve Elias (2010), MS yerine Rugini ve Verma besi ortamının kullanılması durumunda sürgün çoğaltımının artırıldığını rapor etmiştir. *P. khinjuk* (Tilkat 2005, Akdemir ve ark. 2014), *P. atlantica* (Safari ve ark. 2013, Akdemir ve ark. 2014)

türlerinde MS besi ortamı kullanılmıştır. *P. terebinhus* tohumlarından *in vitro* çimlendirilmiş sürgün uçları kullanılarak WPM besi ortamında başarılı bir şekilde prolifere edilebileceği rapor edilmiştir (Barghchi 1985) ancak aynı türün *in vitro* sürgün çoğaltımında DKW, MS ve WPM besi ortamları denenmiş ve DKW'nin daha yüksek çoğaltım değerlerine sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Garcia ve ark. 2012). Sakız ağacı (*P. lentiscus*) tohumlarından *in vitro* çimlendirilmiş sürgün uçları, MS, DKW, QL ve WPM besi ortamı çeşitlerinde proliferasyona tabii tutulmuş ve en iyi sonucun MS besi ortamında elde edildiği rapor edilmiştir (Yıldırım 2012).

Bu çalışmada sürgün proliferasyonuna besi ortamı tipinin etkisi araştırılmıştır. Eksplantlar 1 mgl^{-1} BA ile desteklenmiş ve 7 gr agar ile katılaştırılmış MS, WPM ve SH besi ortamına aktarılmıştır. Yirmi sekiz günlük kültür sonunda, test edilen 3 farklı (MS, SH, WPM) besi ortamı arasında ortalama sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu, kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve prolifere olan eksplant yüzdesi bakımından en etkili besi ortamının MS besi ortamı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

BBD çeşitlerinin sürgün proliferasyonunda etkileri çeşitli bitki türlerinde farklı sonuçlar göstermesine rağmen sürgün proliferasyonunda genellikle BA'nın daha başarılı sonuçlar verdiği ortaya çıkmaktadır.

Fıstık için anaç olarak kullanılan *Pistacia* türlerinde *in vitro* sürgün çoğaltımı için çeşitli BBD ve konsantrasyonları ile ilgili sonuçlar yayınlanmıştır; *P. vera*, *P. terebinthus* ve *P. mutica* türlerinde 5 mg l^{-1} BA (Sheibani ve Williers 1995), *P. vera* türünde 2 mgI^{-1} BA (Onay 2000), Rugini ve Verma (Rugini ve Verma 1983) besi ortamında 0.75 $mg1^{-1}$ NAA + 0.75 $mg1^{-1}$ IAA + 1 $mg1^{-1}$ BA (AL- Safadi ve Elias 2010), 1 $mg1^{-1}$ BA + 1 $mg1^{-1}$ GA_3 (Tilkat-Ayaz ve ark. 2011), 4 mgI^{-1} BA (Benmahioul ve ark. 2012), *P. atlantica* türünde 2 mgI^{-1} BA (Safari ve ark. 2013), *P. trebinthus* türünde 1.12 $mg1^{-1}$ + 0.1 mgI^{-1} IBA (Garcia ve ark. 2012), *P. khinjuk* türünde tohumdan in vitro çoğaltılan sürgün uçlarının 2-4 mgI^{-1} BA (Tilkat 2005) ortamında in vitro mikroçoğaltımları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada olgun buttum ağaçlarından alınan apikal ve lateral sürgünlerden *in vitro* kültür başlatıldıktan sonra, aksenik apikal sürgünler kullanılarak *in vitro*

koşullarda sürgün proliferasyonu için en etkili BBD çeşidi, konsantrasyonu ve karışımını 2 $mg1^{-1}$ BA+0.1 $mg1^{-1}$ IBA olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 4.8, 4.9, 4.10).

Şekerler besi ortamının en önemli komponentleri arasındadır. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmalıdır. Besi ortamında sıklıkla kullanılan şekerler glikoz, maltoz, fruktoz, sukroz ve rafinoz olup bunlar arasında en fazla kullanılan sukrozdur (George 1993).

P. vera (Onay 2000, Benmahioul ve ark. 2012), *P. atlantica* (Safari ve ark. 2013), *P. trebinthus* (Garcia ve ark. 2012), *P. khinjuk* (Tilkat 2005) ve *P. lentiscus* (Yıldırım 2012) türlerinde yapılan *in vitro* sürgün proliferasyonunda besi ortamının 30 $g1^{-1}$ sukroz ile desteklenmesi başarılı sonuçlar vermiştir.

Serada büyütülmüş *P. vera* fidanı sürgünlerinin kullanılmasıyla elde edilen kültürlerde sürgün çoğaltımı için 30 gI^{-1} maltoz ve sukrozdan test edilmiş ve sukrozun daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Sukrozla beraber aktif kömür kullanılması durumunda sürgün sayısı ve uzunluğunda aynı zamanda kök sayısı ve uzunluğunda da önemli artışların olduğu tespit edilmiştir(Al-safadi ve Elias 2010).

Bu çalışmada *in vitro* olarak sürgünlerin çoğaltılmasına şeker tiplerinin (glikoz, fruktoz, sukroz, maltoz) etkisi araştırılmış ve sukrozun diğer şeker tiplerinden daha iyi bir sürgün çoğaltım kapasitesine sahip olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 4.11). Sukrozun farklı konsantrasyonlarının test edildiği deney guruplarında en iyi sonuç 30 $g1^{-1}$ sukrozlu deney gurubunda olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.12). Bu çalışmada da *in vitro* sürgün çoğaltımında sukroz miktarının 20-30 $g1^{-1}$ den daha yüksek olması ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğunda azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.12).

5.4. Köklendirme Çalışmaları

İn vitro mikroçoğaltımda sürgünlerin köklendirilmesi diğer aşamalarda olduğu gibi oldukça önemli bir aşamadır. Bitkicik elde edebilmek için sağlıklı kök ve sürgün sistemi olan eksplantların elde edilmesi şarttır.

İn vitro çoğaltılan sürgünlerin sürgün çoğaltım ortamında bulunan BBD'ler sitokininlerdir (Smith 1992). Tam bir bitki oluşturmak için sürgün sistemine ait bir kök sitemi oluşturabilecek ve sürgün sistemi BBD kompozisyonundan farklı bir BBD kompozisyonuna ihtiyaç vardır. Doku kültüründe köklendirici BBD olarak oksinler kullanılmaktadır (Smith 1992). Köklendirici BBD olarak kullanılan BBD çeşitleri IAA, NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve Pikloram sayılabilir (Babaoğlu ve ark. 2002).

Pistacia türlerinde *in vitro* çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi için çeşitli oksinler kullanılmıştır. *Pistacia* cinsinin bazı türlerinde *in vitro* köklendirmede kullanılan köklendirici BBD'ler ve konsantrasyonları şu şekildedir; *P. vera* türünde *in vitro* çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* koşullarda köklendirme çalışmalarında IBA'nın üç farklı (1, 2, 4 $mg1^{-1}$) konsantrasyonunda da %80 oranında köklenme meydana geldiği ve 4 $mg1^{-1}$ IBA'da sürgün başına düşen ortalama kök sayısı ve ortalama kök uzunluğunun en yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir (Onay 2000).

Erkek antepfıstığı ağaçlarının (*P. vera*) *in vitro* mikroçoğaltılması adlı çalışmada *in vitro* çoğaltılan sürgünler de köklendirme için en uygun oksinin 1 $mg1^{-1}$ IBA olduğu ve %53 oranında köklenmenin elde edildiği rapor edilmiştir (Tilkat ve ark. 2008).

P. vera türünde *in vitro* koşullarda köklenmeyi artırmak için sürgünlerin basal uçlarına 5 $g1^{-1}$ IBA enjekte edilmesi ve daha sonra bu sürgünlerin 30 $g1^{-1}$ sukroz, aktif kömür, 1 $mg1^{-1}$ IBA destekli Rugini ve Verma besi ortamına aktarılması durumunda köklenmede %30 oranında artışın olduğu ve köklenme oranının %73 olduğu ortaya konmuştur (Al-Safadi ve Elias 2010).

Erkek *P. vera* türünde *in vitro* çoğaltılan sürgünler steril saf suyla yıkandıktan sonra 20 dakika 1 $g1^{-1}$ IBA içeren çözeltisinde bekletilmiştir. Bu sürgünler BBD içermeyen 20 g sukroz ve 7 g agar ile desteklenmiş 1/2 MS besi ortamında % 90 oranında köklenme elde edilmiştir (Ayaz-Tilkat ve ark. 2011).

P. terebinthus türünün köklendirilmesinde 1.01 $mg1^{-1}$ IBA destekli WPM ve MS besi ortamlarında sırasıyla %69 ve %21 oranları elde edilmiştir (Garcia ve ark. 2012).

P. atlantica ve *P. khinjuk* türlerinin 2 mg 1^{-1} IBA destekli sıvı MS besi ortamında sırasıyla %50 ve %70 oranında köklendikleri rapor edilmiştir (Akdemir ve ark 2014).

P. lentiscus türünde 1 $mg1^{-1}$ IBA ile desteklenmiş MS ortamı kullanılarak %88 oranında köklenme elde edildiği bildirilmiştir (Yıldırım 2012).

P. khinjuk'un olgun tohumlarından *in vitro* geliştirilen aksenik apikal sürgün uçlarının köklendirilmesi çalışmalarında %100 köklenme oranı 0.5 mgl^{-1} IBA destekli MS besi ortamında elde edilmiştir (Tilkat ve ark. 2005).

P. vera P. terebinthus ve *P. mutica* türlerinde, köklendirme için 5 mgl^{-1} IBA destekli MS besi ortamının etkili sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Sheibani ve Williers 1995).

Bu çalışmada *in vitro* çoğaltılan sürgünleri *in vitro* köklendirmek için çeşitli oksinler (NAA, IBA, IAA, 2,4-D) test edilmiştir. Oksin çeşitlerinden en yüksek köklenme oranı %70 değeri ile 1 mgl^{-1} NAA kullanılması durumunda elde edildiği ortaya konmuştur (çizelge 4.14, çizelge 4.15).

Tilkat (2006), erkek antepfıstığı ağaçlarının (*P. vera*) *in vitro* çoğaltılmasında sürgünlerin köklenmesinde sürgün uzunluğunu etkisini araştırmış ve köklenme yüzdesinin 4 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantlarda en yüksek değerde (%73) olduğunu rapor etmiştir. Çalışmamızda *in vitro* çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi deneylerinde sürgün uzunluğunun etkisi de araştırılmıştır. Sürgün uzunlukları 1-2-3-4 cm olarak belirlenmiş ve köklenme oranının %85 ile en yüksek 1 cm uzunluğundaki sürgünlerde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.16). Fakat, 1 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantların köklenmesi durumunda meydana gelen bitkicikte kök ve sürgün uzunluğu yeterince uzun olmadığından torfa aktarmaya elverişli olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak 3-4 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantların köklenmesi ile elde edilen bitkiciklerin sonraki aşamalarda (aklimatizasyon ve tarla koşullarına aktarma) daha elverişli olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, *in vitro* çoğaltılmış sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi deneylerinde 3-4 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantların, 1 mg l^{-1} NAA destekli

MS besi ortamında 8 saat karanlık/16 saat aydınlık foto periyodu kullanılarak rejenere edilmesi, hedeflenen amaç doğrultusunda daha verimli sonuçların elde edileceği rapor edilmiştir.

5.5. Aklimatizasyon ve Bahçe Koşullarına Aktarma

Dezenfekte koşullarda, yüksek nem içeren, makro ve mikro besin elementleri yönünden zengin bir besi ortamında *in vitro* olarak sürgün ve kök sistemi geliştirilen bitkiciklerin daha düşük nem, daha az makro ve mikro besin elementi içeren ve dezenfekte olmayan dış koşullara sahip bir ortama aktarılması çok dikkat isteyen bir işlemdir. Bitkiciklerin dış ortama aktarılmasında dikkat edilmesi gereken en önemli kısım yüksek nem (%90-100) ihtiyacıdır. Bu nedenle ilk 10-15 gün bitkicikler temiz plastik ile kaplanmalıdır. Ardından aşamalı olarak plastiklerde küçük delikler açılarak nem oranı azaltılmalıdır. Daha sonra ise seralardaki özel alanlara taşınan bitkicikler birkaç gün gölge altında tutulmalıdır. Yaklaşık 4-6 hafta süren bu çalışmalardan sonra bitkicikler normal sera koşullarında yaşamlarına devam etmektedir (Preece ve Sutter 1993).

İn vitro rejenere edilen bitkicikler anatomik ve fizyolojik durumlarından dolayı dış ortama aktarıldıktan sonraki birkaç gün içerisinde yüksek nem içeren bir ortamda tutulmaları hayati önem taşımaktadır (Babaoğlu ve ark. 2002).

İn vitro çoğaltılan *Pistacia* türlerinde de başarılı bir şekilde aklimatize edildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. *P. lentiscus* türünde in vitro köklendirilen sürgünlerden elde edilen bitkicikler dezenfekte torfta %83 dezenfekte olmayan torfta %46 oranında aklimatize edilmiştir (Yıldırım 2012).

P. vera türünün *in vitro* köklendirilmiş sürgünleri %50 oranında aklimatize edilmiştir (Onay 2000).

Erkek antepfıstığı ağaçlarının (*P. vera*) *in vitro* çoğaltılmasında *in vitro* köklendirilen sürgünlerin dezenfekte tofta %95, yarı dezenfekte torfta %62, dezenfekte olmayan torfta ise %10 oranıda aklimatize edildiği bildirilmiştir (Tilkat 2006).

İn vitro köklendirilen *P. vera* bitkiciklerinin aklimatizasyonu için plastik deney tüplerinin altı delinmiş ve bu tüpler torfla beraber dezenfekte edilmiştir. bitkicikler steril

torf içeren plastik deney tüplerine aktarılmıştır. 3 hafta sonra bu tüpler açılmış ve 5 gün boyunca günde 5 dakika ardından ilk gün 15 dakika, günde 15 dakika artırılarak 10 gün boyunca plastik tüplerin ağzı açık bırakılarak nem kontrolü sağlanarak bitkicikler aklimatize edilmiştir (Al-Safadi ve Elias 2010).

P. atlantica ve *P. khinjuk* türlerinde *in vitro* köklendirilen sürgünler den elde edilen bitkiciklerin sırasıyla %70 ve %90 oranında aklimatize edildiği bildirilmiştir (Akdemir ve ark. 2014).

P. khinjuk'un *in vitro* klonal çoğaltılması çalışmalarında köklendirilen sürgünlerin tam dezenfekte torf içerisinde 1-2 hafta kademeli olarak nemlilik oranı azaltılmış ve ikinci yada üçüncü haftanın sonunda dezenfekte olmayan 1:1:1 torf : kum : toprak karışımına % 100 başarı ile transfer edildiği rapor edilmiştir (Tilkat ve ark., 2005).

Bu çalışmada olgun dişi buttum ağacından (*P. khinjuk*) alınan apikal tomurcukların *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve çoğaltılan sürgünlerin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi ile meydana gelen bitkicikler tam dezenfekte, yarı dezenfekte ve dezenfekte olmayan torfun bulunduğu saksılara aktarılmış ve üzeri cam beherlerle kapatılmıştır. 7. günden itibaren 7. günde 10 dakika, 8. günde 20 dakika, 9. günde 1 saat, 10. günde 2 saat, 11. günde 4 saat açma, sonraki iki haftada günde 4 saat kapatma suretiyle ortamın nemi kontrol altında tutulmaya çalışılarak bitkicikler aklimatize edilmiştir. Bu şekilde gelişmeye bırakılan bitkiciklerin 28. gün sonunda tam dezenfekte torfta %60, yarı dezenfekte torfta %40 ve dezenfekte olmayan torfta %20 oranında aklimatize oldukları tespit edilmiştir.

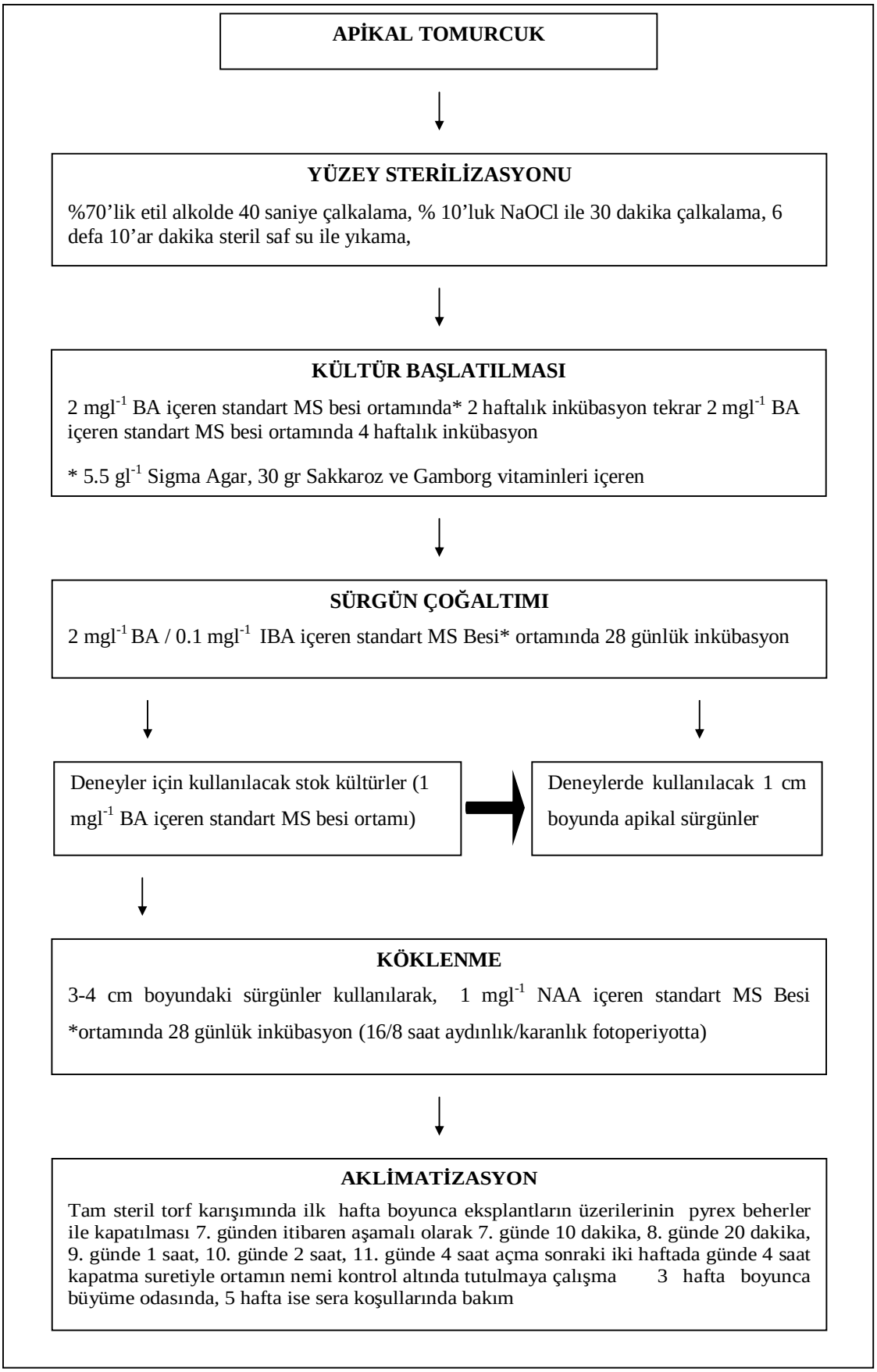
5.6. Somaklonal Varyasyon Analizi

Pistacia türlerine ait bitkilerde, özellikle dokuların yaralanması sonucu ortaya çıkan fenolik bileşikler genomik DNA izolasyonunu güç duruma sokmaktadır (Özden Tokatlı 2005, Akdemir ve ark. 2012, Akdemir 2013, Süzerer 2013). Bu nedenle kit yerine manuel CTAB metodu tercih edilmiştir. Özellikle somaklonal varyasonun belirlenmesinde kullanılan ISSR tekniği içerdiği tekrar dizileri ve ek kullanılan bir veya iki bazla tasarlanan primer ve yüksek bağlanma sıcaklığı spesifik bağlanmayı meydana getirmekte ve hızlı bir şekilde genomun taranmasını sağlamaktadır (Deverumath ve ark. 2002, Bhatia ve ark. 2011). Bu da meydana gelen varyasyonun belirlenmesindeki oranı

artırmaktadır (Süzerer, 2013). Ayrıca olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi için moleküler belirteçler arasından RAPD ve ISSR belirteçleri, uygulanmalarının görece kolaylığı ve ucuzluğu nedeniyle çokça tercih edilmektedir (Bhatia ve ark., 2011). Mikroaşılanan ve mikroçoğaltılan ticari öneme sahip badem [*Prunus dulcis* (mill) D.A. Webb] çeşitlerine ait klonların genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler ile incelenmesi çalışmasında, başarılı mikro aşılama protokolünü takiben uygulanan mikroçoğaltım yönteminin klonlarda önemli bir varyasyona neden olmadığı ortaya çıkartılmış ve diğer badem çeşitlerine de yöntemin uygulanabilir olduğu görülmüştür (Süzerer 2013). Rastgele Çoğatılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği ile genetik karalılığı analiz edilen olgun *P. vera* türünün in vitro korunması ve kriyoprezervasyonu ile ilgili çalışmada, genetik karalılığın yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Akdemir ve ark. 2013). *P. lentiscus* türünde yapılan klonal mikroçoğtım ile elde edilen ve 1 yıl süre ile alt kültürü yapılan eksplantlarda IRAP belirteçleri kullanılarak genetik stabilite analizi yapılmış ve kabul edilebilir düzeyde bir polimorfizimin olduğu rapor edilmiştir (Kılınç ve ark. 2014).

Çalışmamızda yapılan moleküler analiz sonucunda ana bitkiler (Ağaç 1, Ağaç 2) ile klonları arasındaki genetik benzerlik (Çizelge 4.19) ve dendogram şekli (Şekil 4.20) bulgularına bakıldığında varyasyonun olduğu görülmektedir. Ağaç ve klonlarının birbirine olan yakınlığını ve uzaklığını gösteren dendogramda (Şekil 4.20) Ağaç 1, ve Ağaç 2'nin 5. Alt kültürde bir birine daha yakın olduğu artan al kültür sayısına göre bir birinden uzaklaştığı görülmektedir. Bu veriye dayanarak eksplantların kültürde kalma süresi boyunca artan bir varyasyonun meydana geldiği görülmektedir. Bu varyasyon artışının nedeni, bitkilerin yapay bir besi ortamında ve sürekli bitki büyüme düzenleyicisi varlığında uzun süreli altkültürlenmesi olabilir. Çünkü, *in vitro* olarak çoğaltılan bitkilerde, genetik değişim; çoğaltım yöntemi, genotip, başlangıç materyali olarak kullanılan dokunun doğası, büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve derişimi, altkültür süresi gibi durumlarla karşımıza çıkmaktadır (Pierik 1987).

Çalışmada dişi *P. khinjuk* ana bitkiler (Ağaç 1, Ağaç 2) ile *in vitro* koşullarda 24 alt kültür süresince (yaklaşık iki yıl) çoğaltılan klonları arasında en düşük benzerlik oranının % 78.52 en yüksek benzerliğin % 83.85 oranında olduğu görülmektedir. Klonların alt kültürlenmesi süresince ortaya çıkan genetik kararsızlığın başka moleküler belirteçler (AFLP ve SSR gibi) kullanılarak da irdelenmesi gerekmektedir.



Şekil 5.1. Dişi *P. khinjuk* ağacı sürgün uçlarından *in vitro* bitki üretim tekniği ana hatları

6. KAYNAKLAR

Abousalim, A. 1990. Micropropagation and micrografting of pistachio (*P. vera* L. and *Pistacia atlantica* Desf.). PhD Thesis, Department of Horticulture. Wye College, University of London, UK.

Abu-Qaoud, H. 2007. Effect of scarification, gibberellic acid and stratification on seed germination of three *Pistacia* species. ***An - Najah Univ. J. Res. (N. Sc.),*** 21: 1-11.

Aghaei, P., Bahramnejad, B., Mozafari, A.A. 2013. Effect of different plant growth regulators on callus induction of stem explants in *Pistacia atlantica* subsp. Kurdica. ***Plant Knowledge Journal,*** 2(3): 108-112.

Akdemir, H., Süzerer, V., Tilkat, E., Yıldırım H., Onay, A., Özden- Çiftçi, Y. 2013. *İn Vitro* conservation and cryopresevation of mature pistachio (*Pistacia vera L.)* germplasm. ***J. Plant Biochem. Biotechnol.,*** 22 (1):43-51.

Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., Özden- Çiftçi, Y. 2014. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. ***Plant Cell Tiss Organ Cult,*** DOI 10.1007/s11240-013-0421-0.

Almehdi, A.A., Parfitt, D.E., Chan, H. 2002. Propagation of pistachio rootstocks by rooted stem cuttings. ***Sci Hortic***, 96:359–363.

Al-Safadi, B., Elias, R. 2010. Enhancement of pistachio (*Pistacia vera* L.) Propagation *in vitro* utilizing the shoot and embryo culture techniques. ***International Journal of Fruit Science***, 10(1): 96-108.

AL-Saghir, M.G. 2006. Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Ph. D. Thesis, the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 14.

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

AL-Saghir, M.G. 2010. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) based on morphological data. ***Asian Journal of Plant Sciences***, 9: 28-35.

AL-Saghir, M.G., Porter D.M. 2012. Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). ***American Journal of Plant Sciences***, 3, 12-32.

Ameen Nabil, M., Al-Imam, A. 2007**.** effect of soakıng perıods , gıbberellıc acıd , and benzyladenıne on pıstachıo seeds germınatıon and subsequent seedlıng growth (*Pistacia vera* L.). ***Mesoptamia J. of Agric,*** 35(2):20-29.

Arefi, H.M, Abdi, A., Saydian, S.E., Nasirzadeh, A., Nadushan, H.M., Rad, M.H., Golbabaii, H., Azdoo, Z., Ziedabadi, D.D. 2006. Genetics and breeding of Pistacia atlantica in Iran. ***Acta Hortic,*** 726:77–83.

Atli, H.S., Kaska, N. 2002. Pistachio rootstock breeding by crossing Pistacia vera L. and Pistacia khinjuk Stocks. ***Acta Hortic,*** 591:83–89.

Atlı, H.S., Bozkurt, H., Sarpkaya, K. 2014. Antepfıstığı anaçlarının antepfıstığı çeşitlerinin erken çıtlamasına etkisi. ***Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi,*** 7 (1): 30-36

Ayaz Tilkat, E., Namlı, S., Işıkalan, Ç., 2011. Determination and assesment of the sex chromosomes of male trees of pistachio (*Pistacia vera* L.) using *in vitro* culture. ***AJCS,*** 5(3):291-295.

Ayfer, M., Serr, E.F. 1961. Effect of gibberellin and other factors and seed germination and early growth in pistachio species. ***Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.,*** 77: 308-315

Ayfer, M., Okay, Y., Erdogan, V. 1990**.** Antepfıstığı anaçları ve çoğaltılmaları. ***Türkiye 1. Antepfıstıgı Sempozyumu Bildirileri,*** 11-12 Eylül 1990- Gaziantep, Pp. 38-48.

Babaoğlu, S., Yorgancıoğlu, M., Akbudak, M.A. 2002. Doku Kültürü: temel laboratuar teknikleri: bitki biyoteknolojisi-I, doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374, Konya.

Bahmani, M., Eftekhari, Z. 2012. An ethnoveterinary study of medicinal plants in treatment of diseases and syndromes of herd dog in southern regions of Ilam province, Iran. ***Comparative Clinical Pathology,*** 22(3): 1–5

Barghchi, M. 1982. *İn vitro* propagation of *Pistacia* species. PhD Thesis, Nottingham University, UK.

Barghchı, M., Martınellı, A. 1984. *In vitro* propagation of mature *Pistacia vera* varieties of Kerman (female) and Peter's (male) pistachio. 41st Easter School Symp. Plant tissue culture and its agricultural applications. Univ. of Nottingham, Abst 75

Barghchı, M. 1985. *In vitro* culture of mature commercial varieties of *Pistacia vera* L. ***Proceeding of International Plant Propagators Society,*** 35: 331-333.

Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M., Daguin, F. 2012. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (Pistacia vera L.). ***Plant Cell Tiss Organ Cult.,*** 108:353–358.

Bhatia, R., Singh, K.P., Sharma, T.R. and Jhang, T. 2011. Evaluation of thegenetic fidelity of *in vitro* propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 104: 131-135.

Bilgen, A.M. 1968. Memleketimizde bulunan antep fıstığı anaçları ve aşılama tekniği,tarım Bak. Ziraat İşleri gen. Müd. Yayınları. Ankara

Boissier, E. 1849. Diagnoses Plantarum Orientalium Novarum. ***Paris, Typis Marci Ducloux et Cons. Series,*** 1, 2 (9): 1

Braun, A.C. 1959. A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 45 : 932–938.

Brown, D.C.W., Thorpe, T.A., 1995. Crop improvement through tissue culture. ***World J. Microb. Biotech.,*** 11: 409-415.

Bunge, A. 1835. Mémoires des savantes étrangers de l'academié de Saint – Pétersbourg. 2: 89.

Can, C., Özaslan, M., Töremen, H., Sarpkaya, K., İskender, E. 2006. In vitro micrografting of pistachio, pistacia vera L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. ***Journal of Cell and Molecular Biology,*** 5: 25-31.

de Candolle, A. 1825. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. ***Paris, Treuttel & Würtz,*** 2: 61-92.

Carlson, F.R. 2002. Dwarfing rootstocks: past, present and future.the 45th annual *IDFTA* Conference, Canada, 67-72.

Chao, C.T., Parfitt, D.E., Ferguson, L., Kallsen, C., Maranto, J. 2003. Genetic analyses of phenological traits of pistachio (Pistacia vera L.). ***Euphytica,*** 129:345–349.

Crane, J.C. 1974. Hermaphroditism in *Pistacia*. ***Calif Agric,*** 28:3–4.

Çetiner, S., Yücel, H., Aka-Kaçar, Y., Yalçin-Mendi, Y. 1997. Clonal propagatıon of *Pistacia* rootstocks by merıstem and shoot culture. ***Acta Hort.,*** (ISHS) 441:333-336.

Desfontaines, R.L. 1799. Flora atlantica; sive historia platarium quae in atlante, agro Tunetano et Algeriensi crescent. ***Paris, L. G. Desgranges,*** 2: 364

Devarumath, R.M., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N. and Raina, S.N. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic

integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and C. assamica ssp. Assamica (Assam-India type). ***Plant Cell Rep,*** 21:166–173.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. ***Phytochemical Bulletin,*** 19: 11-15.

Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. 1984. *In vitro* Propagation of paradox walnut rootstock. ***HortScience,*** 19: 507-509

El-Maarri, O. 2003. "Methods: DNA methylation"., Advances in Experimental. ***Medicine and Biology,*** 544: 197–204.

Engler, A. 1883. Anacardiaceae. In: De Candolle, A. L. P. (ed.). ***Monographiae phanerogamarum.***

Esfandiyari, B., Davarynejad, G.H., Shahriari, F., Kiani, M., Mathe, A. 2011. Data to the sex determination in Pistacia species using molecular markers. ***Euphytica,*** DOI 10.1007/s10681-011-0527-6.

Esmat, A., Al-Abbasi, F.A., Algandaby, M.M., Moussa, A.Y., Labib, R.M., Ayoub, N.A., Abdel-Naim, A.B. 2012. Anti-inflammatory activity of *Pistacia khinjuk* in different experimental models: isolation and characterization of its flavonoids and galloylated sugars. ***J. Med. Food Mar,*** 15(3): 278-287.

Esmail-pour, A. 1998. Evaluation, identification and collectionof male pistachio cultivars. Annual report for pistachio research institute, Rafsanjan, İran.

Evans, D.A. 1988. Applications of Somaclonal Variation. ***Biotechnology in Agriculture,*** 203-223.

FAO, 2012. Food and Agriculture Commodities. Erişim: [http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html]. Erişim tarihi 30.09.2014

Franchet, A. 1886. Plantae Yunnanenses. ***Bulletin de la Société Botanique de France, Parism.,*** 33: 467.

Fischer, F.G., Meyer, A. 1838. Bulletin de la sociétè impérale des naturalists de Moscow. 4: 338.

Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to Arabidopsis thaliana (L.). ***Heynh. Plant Growth Regul.,*** 43:27–47.

Gamborg, O.L., Miller, P.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. ***Exp. Cell. Res.,*** 50: 151–158.

Garcıa, A.A.F., Benchımol, L.L., Barbosa, A.A.M., Geraldı, I.O., Souza, Jr. C.L., De Souza, A.P. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. ***Genet. Mol. Biol.,*** 27, 579-588.

Garcia, E., Imbroda, I., Lorente, P., Marín, J.A., Arbeloa, A., Padilla, I.M.G., Barceló, A., Andreu, P. 2012. Mıcropropagatıon and ın vıtro graftıng technıques to assıst the selectıon of a pıstachıo rootstock from a populatıon of terebınth (*pıstacıa terebınthus* l.) Collected ın the se of Spain. ***Acta Hort.,*** (ISHS) 961:245-252.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I. The technology, second edition, Pages: 574. Exegetics Ltd. England.

Ghaffari, S.M., Harandi, O.F. 2002. Chromosome counts and assessment of two heterochromatic chromosomes in some species of *Pistacia* L. from Iran . ***Acta Hort.,*** 591: 389-393.

Ghaemmaghami, L., Attar, F., Rahiminejad, M.R. 2013 06 30: Distinctness and inter relationships of Pistacia L. species in Iran as evidenced by retroelement insertional polymorphisms (IRAP method). ***Iran J. Bot.,*** 19 (2): 78-85.

Ghasemi Pirbalouti, A. 2009. Medicinal plants used in chaharmahal and Bakhtyari districts, Iran. ***Herba Polon,*** 55: 69-75.

Ghasemi Pirbalouti, A., Aghaee, K. 2011. chemical composition of essential oil of *pistacia khinjuk* stocks grown in Bakhtiari Zagross mountains, Iran. ***Electronic Journal of Biology,*** 7(4): 67-69.

Gijón, M.C., Gimenez, C., Perez-Lopez, D., Guerrero, J., Couceiro, J.F. and Moriana, A. 2010. Rootstock influences the response of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Kerman) to water stress and rehydration. ***Sci. Hortic.,*** 125: 666-671

Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W. 2003. Plant biology. Prentice hall, inc., Yayın No: QK47 G.68, sayfa: 580. Wisconsin.

Gökçe, M. H., Akçay, M. 1993. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Gen. Müd. Antep fıstığı çeşit kataloğu syf. 48

Guerrero, J., Couceiro, J.F., Moriana, A. 2002. Selection of Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) trees as seed producers for pistachio (*Pistacia vera* L) rootstocks in the Castilla La Mancha (Spain). ***FAO-Nucis-Newsletter,*** 11: 25-29.

Hopkins, W.G. 2006. Plant Biotechnology. Chelsea House, Yayın No: 2006008157, Sayfa: 630. New York.

Hormaza, J.I., Wünsch, A. 2007. Chapter 12: Pistachio. In: Kole C (ed) Genome mapping and molecular breeding in plants. ***Fruits and nuts,*** 4: 243–251.

Humboldt, F., Bonpland, A.J., Kunth, C. 1824. Nova genera et species plantarum. Paris, Sumptibus librariae graeco-latini-germanicae 7: 22, t. 608.

Hussaın, A. 2012. Micro-propagation studies in juvenile tissues of *Pistacia vera* L. ***Bıologıa (Pakıstan),*** 58 (1&2): 101-121

Joley, L.E. 1953. Experiment with propagation of the genus *Pistacia*. ***Proceeding of İnternational society,*** 10: 287-292.

Jiang, C., Sink, K.C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in *Asparagus*. ***Euphytica,*** 94: 329–333.

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. ***Plant Molecular Biology,*** 43:179-188.

Kafkas, S., Perl-Treves, R. 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. ***Theoretical and Applied Genetics,*** 102: 908-915.

Kafkas, S., Kafkas, E., Perl-Treves, R.**.** 2002. Morphological diversity and a germplasm survey of wild *Pistacia* species in Turkey. ***Genetic Resources and Crop Evolution,*** 49: 261-270.

Kafkas, S., Ak, B.E., Özgüven, A.I. 2006c. Performances of different *Pistacia* genotypes. ***Acta Hortic.,*** 726:143–145.

Karp, A. 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) Plant cell and tissue culture. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers; p 139-152

Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden-Çiftçi, Y. Onay, A., Yıldırım, H., Altınkut-Uncuoğlu, A., Tilkat, E., Koç, İ., Akdemir, Ö.F., Karakaş–Metin, Ö. 2014. Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. ***Plant Growth Regulation,*** DOI 10.1007/s10725-014-9933-9.

Kokwaro, J.O., Gillett, J.B. 1980. Notes on the Anacardiaceae of Eastern Africa. ***Kew Bulletin,*** 34: 745-760.

Krishna-pillay, B. 2000. Silviculture and management of teak plantations. Unasylva, No. 201 Teak. Int J Forestry Forest Ind (FAO) 51-2000/2

Kuru, C., Uygur, N., Tekin, H., Karaca, R., Akkök, F., Hanci, G. 1986. Antep Fıstığı yetiştiriciliği ve Mücadelesi. Tarım Orman ve Köyişleri Bak. Proje ve Uyg. Gen. Müd. Gaziantep Zirai Araş. Ens. Yay. No:2.

Kuru, C., Aksu, Ö. 1995. Effect of gıbberellın and other treatments on seed germınatıon of *Pıstacıa* specıes. ***Acta Hort.,*** (ISHS) 419:125-128

Kuru, C., özsabuncuoğlu, İ.H. 1990. Yabani Pistacia Türlerinin Aşılanmasında sorunla ve çözüm yolları, Türkiye Birinci Antep Fıstığı Sempozyumu Kitabı syf. 49.

Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell culture for plant improvement. ***Theor Appl Genet,*** 60:197–214

Linnaeus, C. 1753. Species Plantarum. Stockholm, Laurentii Salvii 2: 1025

Lloyd, G., Cown, M.B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. ***Comb Proc. Int. Plant Prop. Soc.,*** 30, 421–427.

Manıfesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Suarez, E.Y., Dubcovsky, J., 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. ***Crop Sci.,*** 41, 682-690.

Mansuroğlu, S., Gürel, E. 2002. Mikroçoğaltım, bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları Kitabı-1 Editörler: Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin Özcan, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları s. 262-281. Konya.

Marchand, N.L. 1869. Révision du groupe des Anacardiaceae. ***J. B. Bailliére et Fils,*** 96-102.

Martelli, U. 1886. Florula bogosensis. Enumerazione delle plante dei bogos. Firenze, Tipografia di Mariano Ricci. P. 24

Martınelli, A. 1988. Use of *in vitro* techniques for selection and cloning of different *Pistacia* species. ***Acta Horticulture,*** 227: 436-437

Mehrnejad, M.R. 2003. Three *Pistachio* species evaluated for resistance to the common *Pistachio Psylla*, *Agonoscena pistaciae*. Proccedings: IUFRO Kanazawa, "Forest Insect Population Dynamics and Host Influences" pp. 58-62

Mehlenbacher, S.A. 2003. Progress and prospects in nut breeding. ***Acta Hortic.,*** 622:57–79.

Molina, S.M., Trujillo, M.I. 1999. Techniques for in vitro seed germination in *Pistacia* species. ***S. Afr. J. Bot.,*** 65:149–152.

Morel, G. 1960. Production virus-free *Cymbidiums*. ***Am. Orchid Soc. Bull.,*** 29: 495-497.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum,*** 15. 473-497

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, ***Genetics,*** 89 **(**583-590.

Noormohammadi, Z., Foroutan, M., Sheidai, M., Alishah, O. 2014. Chromosome pairing and genome size analysis in F1 and F2 offspring derived from crossing *Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*. ***Gene Conserve,*** (52):14-26.

Onay, A. 1996. *In vitro* organogenesis and embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. PhD Thesis, University of Edinburgh, 198 pp.

Onay, A. 2000. Micropropagation of Pistachio from mature trees**.** ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture,*** 60**:** 159–162.

Onay, A,. Jeffree, C.E., Theobald, C., Yeoman, M.M. 2000. Analysis of the effects of maturation treatments on the probabilities of somatic embryo germination and plantlet regeneration in pistachio using a linear logistic method. ***Plant Cell Tiss Org Cult.,*** 60:121–129.

Onay, A., Pirinç¸ V., Tilkat, E., Aktürk, Z., Yıldırım, H. 2004b. Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. ***J Hortic Sci Biotechnol.,*** 79:960–964.

Onay, A., Pirinç¸ V., Yıldırım, H., Başaran, D. 2004a. In vitro micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). ***Plant Cell Tiss Org Cult.,*** 77:215–219.

Orbovic, V., Calovic, M., Viloria, Z., Nielsen, B., Gmitter, F., Castle, W., Grosser, J. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. ***Euphytica,*** 161: 329-335.

Özbek, S. 1978. Özel meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 128, Sayfa: 486 . Ankara.

Özden-Tokatlı, Y. 2005. Antepfıstığı (*P. vera* L.) bitkisinin doku kültürü yöntemleri ile *in vitro* rejenerasyonu ve mikroçoğlatımı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstittüsü, Doktora Tezi, s 195.

Özden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Tilkat, E., Onay, A. 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. ***Biotechnol Adv.,*** 28:130–141.

Öztürk, K., 2002. Küresel İklim Değişikliği ve Türkiye'ye Olası Etkileri. ***G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi,*** 22 (1): 47-65.

Padulosi, S., Hadj-Hassan, A. 2001. Towards a comprehensive documentation and use of *Pistacia* genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Europe. Report of the IPGRI Workshop, 14-17, Irbid, Jordan.

Parfitt, D.E., Almehdi, A.A. 1994. Use of high CO2 atmosphere and medium modifications for the successful micropropagation of pistachio. ***Sci Hortic.,*** 56:321–329.

Parfitt, D.E., Badenes, M.L., Ferguson, L., Maranto, J., Almehdi, A., Guo Yang, L. 1995. Pistachio breeding and genetics program at the University of California. ***Acta Hortic.,*** 419:279–280.

Parfitt, D.E., Badenes, M.L. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. ***Proceedings of the National Academy of Sciences,*** USA 94: 7987-7992.

Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland.

Pontikis, C.A. 1984. In vitro propagation of *Pistacia terebinthus* L. ***The plant propagator,*** 31, 14-15.

Peredo, E.L., Revilla, M.A., Arroyo-Garcia, R. 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organic calli. ***J. Plant Physiol.,*** 163:1071–1079.

Preece, J.E., Sutter, E.G. 1993. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhause and field. Micropropagation Technology and Application, Kluwer Academic Publishers, 155-167. Dordrecht, Holland.

Rahemi, M., Baninasab, B. 2000. Effect of gibberellic acid on seedling growth in two wild species of pistachio. ***Journal of Horticultural Science and Biotechnlogy,*** 75 (3): 336-339.

Rani, V., Parida, A., Raina, S. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. ***Plant Cell Report.,*** 14:459-462.

Rosenberg, M.R., Mark,N., Richard, W.R., Brian, L.P. 1998. Hallan Çemi, pig husbandry, and post-Pleistocene adaptations along the Taurus-Zagros arc (Turkey). ***Paléorient,*** 24(1):25–41.

Rugini, E., Verma, D.C. 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond *(Prunus amygdalus*, batch) cultivar. ***Plant Sci. Letters,*** 28: 273-281

Reyna-Lopez, G.E., Simpson, J. Ruiz-Herrera, J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. ***Mol. Gen. Genet.,*** 253:703- 710.

Safari, Z., Mehrabi, A.A., Arminian, A., Safari, S. 2013. Rapid micropropagation of *P.atlantica* subsp mutica. ***International Journal of Agriculture and Crop Sciences,*** 5 (3): 280-284.

Salehi- Surmaghi, M. 2010. Medicinal plants and phytotherapy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Smith, R. 1992. Plant tissue culture techniques and experiments. pp. 1-27, Akademic press Inc., UK.

Smýkml, P., Valledor, L., Rodríguez, R., Griga, M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). ***Plant Cell Rep,*** 26:1985–1998.

Schenk, R.U., Hildebrant, A.C., 1972. medium and techniques for ınduction and growth of monocotyledonous and dicaotyledonous. ***Plant Cell Cultures. Can. J. Bot.,*** 50: 199-204.

Sheibani, A., Williers, T. 1995. Effect of explants type and culture medium on micropropagation of three *Pistacia* species. ***Acta Horticulturae,*** 419: 229-232.

Sheidai, M., Kolahizadeh, K., Noormohammadi, Z., Azani, N., Nikoo, M. 2012. Correlation between geography and cytogenetic diversity in Pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. ***Acta Botanica Brasilica,*** 26(4):948-957.

Stockmans, F., Hooker 1852. Notes on Beloochistan plants. ***Hooker's Journal of Botany and Kew Garden Miscellany,*** 4: 143

Stevens, P.F. 2008. Angiosperm phylogeny website. Version 9. Erişim: [http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/]. Erişim Tarihi: 16.06. 2008

Swingle, W.T. 1920. A new species of *Pistacia* native to southwestern Texas, *P. texana.* ***Journal of the Arnold Arboretum,*** 2: 105-110.

Quoirin, M., Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *ın vitro* de *Prunus*. ***Acta Horticulturae,*** (78) 437: 42.

Taghvaeefard, N., Sadeghi, H. 2014 Allelopathic effect of pistacia khinjuk leaf extracts on chenopodium album, physalis alkekengi and amaranthus retroflexus. ***Sjournals,*** 3(2): 33-37.

Taran, M. Azizi, E., Shikhvaisi, A., Asadi, N. 2009. The anthelmintic effect of *Pistacia khinjuk* against protoscoleces of *Echinococcus granulosus.* ***World Journal of Zoology,*** 4 (4): 291-295.

Taran, M., Sharifi, M., Azizi, E., Khanahmadi, M. 2010. Antimicrobial activity of the leaves of *Pistacia khinjuk*. ***Journal of Medicinal Plants,*** 9(6): 81-85

Tekin, H., Arpaci, S., Atli S., Açar, İ., Karadağ, S., Yükçeken, Y., Yaman, A. 2001. Antepfıstığı yetiştiriciliği kitabı. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Sayfa: 9-38. Ankara.

Tous, J., Ferguson, L., 1996 "Mediterranean Fruits". In: J. Janick, Ed., Progress in New Crops, ASHS Press, Page: 416-430. Arlington.

Tilkat, E., Işıkalan, Ç., Onay, A. 2005. Invitro Propagation of Khinjuk Pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture. ***Propagation of Ornamental Plants,*** 5(3): 1-5.

Tilkat, E., Onay, A., Özen, H.Ç. 2008. Erkek antepfıstıgı agaçlarının (*Pistacia vera* L.) *in vitro* mikroçogaltılması. ***Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi,*** 20 (1): 15-22

Tilkat, E., 2006. "Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera L. cv. 'Atlı'*) Ağaçlarının *in vitro* Mikroçoğaltılması., Doktora Tezi, Dicle üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 144.

Tilkat, E., Onay, A., Yıldırım, H., Özen, H.C. 2008a. Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L. ***The Journal of Horticultural Science & Biotechnology,*** 83: 328-333

Tilkat, E., Özden-Tokatlı, Y., Onay, A. 2008c. In vitro rooting improvement of adult pistachio, *Pistacia vera* L. cv. "Atlı", 1st International Symposium on Biotechnology of Fruit Species (Biotechfruit2008), September 1-5, 2008, Dresden, Germany.

Tilkat, E., Onay, A. 2009a. Direct shoot organogenesis from in vitro derived mature leaf explants of pistachio. ***In Vitro Cell.Dev.Biol.-PLANT,*** 45:92-98.

Tournefort, J.P. 1700. Institutiones Rei Herbariae. ***Typographia regia,*** 579-580.

TUBİVES, 2014. Erişim: [http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=2379]. Erişim Tarihi: 09.04.2014

Türkeş, M., 1998a. İnfluence of Geo-Pontential Heights Cyclon Frequency and Southern Oscillation on Rainfall Variationin Turkey. ***International Journal of Climatology,*** 18: 649–680.

Ulusaraç, A. 1992. Mevcut standart Antepfıstıklarına Anaç Seçimi. III. Arasonuç raporu (Basılmamış), Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep.

Vargas, F.J., Romero, M.A., Vargas, I. 2002. Flowering precocity in pistachio progenies. ***Acta Hortic.,*** 591:297–303.

Yaltirik, F. 1967a. Anacardiaceae. In Davis P. H. (ed***.).*** Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press**,** 2: 544-548. Edinburgh.

Yaltirik, F. 1967b. Anacardiaceae. Contributions to the taxonomy of woody plants in Turkey. ***Notes from the Royal Botanical Garden,*** 28: 11-12.

Yıldırım, H. 2012. Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. ***Scientia Horticulturae,*** 137: 29–35.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. ***Nucleic Acids Res.,*** 23:4407–4414.

Willams, J.G.K., Kubelik, A.R., Liuak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. ***Nucleic Acids.Res.,*** 18:6531-6535.

Zeitkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR amplification. ***Genomics,*** 20:176-183.

Zohary, M. 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. ***Palestine Journal of Botany***, Jerusalem Series 5: 187-228.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1978 tarihinde Batman Beşiri ilçesinin Asmadere Köyü'nde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Batmanda tamamladım. 1997 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2001 yılında bu bölümden mezun olduktan sonra Milli Eğitim Bakanlığı'na biyoloji öğretmeni olarak atandım.

2006 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım. 13.11.2009 tarihinde ''Elektrik Akımının Patates (*Solanum tuberesum*) ve Soğan (*Allium cepa*) Bitkilerindeki Yumru ve Soğan Dormansisi Üzerine Etkisinin Araştırılması'' konulu yüksek lisans tezimi tamamladım.

2010 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimime başladım. 29.09.2014 tarihinde ''Dişi Buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağaçlarının *İn Vitro* Mikroçoğaltımı'' konulu doktora tezimi tamamladım.

Halen Batman İMKB Anadolu Lisesi'nde biyoloji öğretmeni olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.