T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELEZ *Pistacia* L. GENOTİPLERİNİN KLONAL MİKROÇOĞALTIMI VE IRAP-ISSR MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

NAZAN ÇALAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Mart-2018

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELEZ *Pistacia* L. GENOTİPLERİNİN KLONAL MİKROÇOĞALTIMI VE IRAP-ISSR MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

NAZAN ÇALAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Mart-2018

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

NAZAN ÇALAR tarafından yapılan "MELEZ *Pistacia* L. GENOTİPLERİNİN KLONAL MİKROÇOĞALTIMI ve IRAP-ISSR MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİYLE GENETİK KARARLILIKLARININ BELİRLENMESİ" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan:. **Prof. Dr. Hasan ÇETİN ÖZEN**

Üye : **Prof. Dr. AHMET ONAY**

Üye : **Prof. Dr. HALUK AYDIN**

Üye : **Prof. Dr.ENGİN TİLKAT**

Üye : **Doç. Dr HAKAN YILDIRIM**

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 06/03/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../201..

Doç.Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarım boyunca yönlendirici katkılarından dolayı başta danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a içten teşekkürlerimi sunarım. Lisans öğrenciliğimden bu yana benden maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hayatım boyunca karşılaşabileceğim nadir insanlardan olan değerli hocam Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a eğitim hayatım bütün aşamasına her anlamda katkı sağlamış olduğu için samimi ve içten ilgilerinden dolayı kendilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde çalışabileceğim laboratuvar ortamını sağlayarak bana her açıdan çok büyük destek olan ve deneysel çalışmalarım sırasında çok değerli yardımlarını ve desteğini gördüğüm, derin bilgi ve deneyimlerini sürekli benimle paylaşan tez yazımında da çok büyük desteğini gördüğüm Doç. Dr. Hakan YILDIRIM ve eşi Hülya YILDIRIM'a ayrıca teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın önemli bir kısmında bilgi ve desteğini benden esirgemeyen hoşgörülü ve yakın ilgilerinden dolayı ikinci danışmanım Dr. Hülya AKDEMİR'e teşekkür ederim.

Büyük bir emek ve özveri gerektiren bilimsel çalışmalarım boyunca karşılaştığım her türlü sıkıntı ve zorlukta yanımda olan manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özgür KARAKAŞ'a teşşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarını başlatacak tohum materyallerinin temininde emeği geçen Gaziantep Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına ve özellikle Islah ve Genetik Bölümü personeli Ertuğrul İlikçioğlu'na teşekkür ederim.

Zorluklarla dolu doktora çalışmalarım boyunca en zor anlarımda bile yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Selçuk KURT'a, üniversite hayatının bana kazandırdığı en güzel şey olan, en zor anlarımda en büyük destekçim olan tanıyabileceğim en nadide insan Selma POYRAZ'a, hayatıma bu şekilde yön vermemde çok büyük emekleri olan durumda yardımıma koşan ve her şeyimi borçlu olduğum 2012 ocak ayında aramızdan ayrılmış olan yokluğu ve sevgisini her zaman hissedeceğim canım babam Mustafa ÇALAR'a, biricik annem Nazime ÇALAR'a ve sevgili ablam Nazlı ÇALAR KURT'a, kardeşlerim M. Kerem, Canan, Büşra ve Ö. Kürşat'a sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma;

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **Fen.16.003 nolu proje** kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……		I
İÇİNDEKİLER……...		III
ÖZET……...		IX
ABSTARCT……		XI
ÇİZELGE LİSTESİ……		XIII
RESİMLER LİSTESİ……		XVII
KISALTMA VE SİMGELER……		XXVI
1.	**GİRİŞ……...**	1
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ……...**	9
2.1.	*Pistacia* spp.……...	9
2.1.1.	Orjini ve Tarihçesi……	9
2.1.2.	Ekolojik İstekleri……...	11
2.1.3.	Anaç Özellikleri ve Üretim Durumu…….	11
2.1.3.1.	*Antepfıstığı (P. vera* L.)……	13
2.1.3.2.	*Buttum (P. khinjuk* Stocks)……...	14
2.1.3.3.	*Atlantik Sakızı (P. atlantica* Desf.)……...	15
2.1.3.4.	*Melengiç (P. terebinthus* L.)…….	15
2.2.	Antepfıstığı Islahı İle İlgili Çalışmalar…….	17
2.3.	Anaç Olarak Kullanılan *Pistacia* Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Klonal Anaç Kullanımının Önemi……	23
2.4.	Moleküler Belirteçler İle İlgili Genel Literatür Özeti……...	28
2.4.1.	Somaklonal Varyasyonlar…….	28
2.4.1.1.	Bitki Doku Kültüründe Ortaya Çıkan Varyasyonların Nedenlerinin Belirlenmesi……..	30
	-Eksplant kaynağı……	32
	-Kültür periyodunun uzunluğunun ve alt kültür döngü sayısının etkisi…..	32
	-Genotip ve poliploidi……..	33

	-Kültür ortamı……..	34
2.4.1.2.	Doku Kültüründe Varyasyonun Belirlenmesi……...	35
2.4.1.3.	Somaklonal Varyasyonun Moleküler Temeli……...	36
2.4.1.4.	Somaklonal Varyasyonlar Aracılığıyla Ürün Islahı……..	37
	-Avantajları……..	38
	-Dezavantajları…….	38
2.4.1.5.	Somaklonal Varyantların İyileştirilmesi……...	39
2.4.1.6.	Somaklonal Varyasyonların Uygulamaları……...	40
2.4.1.7.	Somaklonal Varyasyonun Kökeni……	40
2.4.1.8.	Somaklonal Varyasyonun Nedenleri……	40
2.4.1.9.	Somaklonal Varyasyonun Meydana Gelmesinden Sorumlu Mekanizmalar	41
	-Kromozomlardaki Sayısal ve Yapısal Değişiklikler……	41
	-Gen Seviyesindeki Değişiklikler…….	42
2.4.1.10.	Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi……	43
2.4.1.11.	Somaklonal Varyasyonların Moleküler Düzeyde Tespitinde Kullanılan Moleküler Belirteçler……	43
	-DNA/Moleküler Belirteçler……..	44
2.4.1.13.	Temel Moleküler Belirteç Tekniği……	45
	-ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)……..	45
	-Retrotranspozan Temelli Moleküler Belirteçler (IRAP ve REMAP)……	46
2.5.	*Pistacia* Türlerinde Yapılan Genetik Çeşitlilik ve Genetik Kararlılığın Belirlenmesi Çalışmaları……...	49
3.	**MATERYAL VE METOT……**	61
3.1.	Materyal……	61
3.1.1	Melezleme Çalışmaları…….	61
3.1.1.1.	Sürgünlerin İzolasyonu…….	61
3.1.1.2.	Çiçek Tozu Eldesi ve Muhafazası…….	62
3.1.1.3.	Melezlemelerin Yapılması……	62
3.2.	Metot……	65

3.2.1.	Kültür Besi Ortamı……	65
3.2.1.1.	Besi Ortamının İçeriği……...	65
3.2.1.2.	Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu……...	65
3.2.1.3.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması……	66
3.2.2.	Yüzey Sterilizasyonu Teknikleri……...	66
3.2.2.1.	Isı ile Sterilizasyon……..	67
3.2.2.2.	Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu…….	67
3.2.2.3.	Cam Malzemelerin Sterilizasyonu……	67
3.2.2.4.	Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu……	67
3.2.2.5.	Kullanılan Aseptik Yöntemler……..	68
3.2.2.6.	Sterilizasyonun Korunumu……...	68
3.2.3.	Kültür Şartları……...	68
3.2.3.1.	Büyüme Odası Koşulları……..	68
3.2.3.2.	Aklimatizasyon Şartları (Adaptasyon Odası)……..	68
3.3.	Araştırmada Kullanılan Yöntemler……..	69
3.3.1.	Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları……	69
3.3.1.1.	Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…….	70
3.3.1.2.	Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna %10'lik NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi…….	70
3.3.2.	Kültür Başlatma Çalışmaları……	71
3.3.2.1.	Tohumların *in vitro* Çimlenmesine BBD'siz ortamın Etkisi……	71
3.3.2.2.	Tohumların *in vitro* Çimlenmesine BBD'li ortamın Etkisi……..	71
3.3.2.3.	*İn vitro* Çimlenmiş Tohumların Aklimitizasyonu……	71
3.3.3.	Stok Kültürlerin Elde Edilmesi…….	72
3.3.4.	Sürgün Proliferasyon Çalışmaları…….	72
3.3.4.1.	Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi……...	72
3.3.4.2.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Kuvvetlerinin Etkisi…….	73
3.3.4.3.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Aminoasit Çeşitlerinin Etkisi……	73

3.3.4.4.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Karbonhidrat Tiplerinin Etkisi……..	73
3.3.4.5.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi……..	73
3.3.4.6.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi…….	73
3.3.4.7.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Sitokinin Konsantrasyonunun Etkisi…….	74
3.3.4.8.	Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin Oksin Kombinasyonunun Etkisi……...	74
3.3.5.	Köklendirme Çalışmaları……..	74
3.3.5.1.	Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi……..	75
3.3.5.2.	Sürgünlerin Köklenmesine En İyi Oksin Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi……..	75
3.3.5.3.	Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi…….	75
3.3.6.	Aklimatizasyon Çalışmaları…….	75
3.4.	Verilerin Değerlendirilmesi…….	76
3.5.	Somaklonal Varyasyon Çalışmaları…….	76
3.5.1.	Bitki Materyali…….	76
3.5.2.	CTAB Yöntemi İle Genomik DNA İzolasyonu……..	77
3.5.3.	ISSR Analizleri…….	78
3.5.4.	IRAP Analizleri……	79
3.6.	ISSR ve IRAP Verilerinin Değerlendirilmesi……...	81
4.	**BULGULAR VE TARTIŞMA……...**	83
4.1.	Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları…….	83
4.1.1.	Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi……..	83
4.1.2.	Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna %10'lik NaOCl'te Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi……..	85
4.2.	Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma……	87
4.3.	Kültür Başlatma Çalışmaları…….	91
4.3.1.	Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'siz Ortamın Etkisi……...	91
4.3.2.	Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'li Ortamın Etkisi…….	92
4.3.3.	*İn vitro* Çimlenmiş Tohumların Aklimitizasyonu……	100

4.4.	Kültür Başlatma ile İlgili Genel Değerlendirme……..	106
4.5.	Aksenik Klonal Hatların Üretimi…….	109
4.6.	Sürgün Proliferasyon Çalışmaları……	112
4.6.1.	Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi……..	112
4.6.2.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Kuvvetlerinin Etkisi…….	115
4.6.3.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Aminoasit Çeşitlerinin Etkisi……	116
4.6.4.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Karbonhidrat Çeşitlerinin Etkisi……	122
4.6.5.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi……..	124
4.6.6.	Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Çeşidinin Etkisi……..	127
4.6.7.	Sürgün Proliferasyonuna En İyi Sitokinin Konsantrasyonunun Etkisi…….	132
4.6.8.	Sürgün Proliferasyonuna BA - Oksin Kombinasyonunun Etkisi…….……	136
4.7.	Sürgün Proliferasyon Çalışmalarıyla İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma……	138
4.8.	Köklendirme Çalışmaları…….	142
4.8.1.	Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi…….	142
4.8.2.	Sürgünlerin Köklenmesine IBA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi…	143
4.8.3.	Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi……..	144
4.9.	Köklendirme Çalışmalarıyla İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma…….	151
4.10.	Aklimatizasyon…….	155
4.11.	Aklimatizasyon ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma……	161
4.12.	Somaklonal Varyasyonların Değerlendirilmesi……	163
4.12.1.	CTAP Genomik DNA İzolasyonu……	163
4.12.2.	Somaklonal Varyasyonların ISSR ve IRAP Analizleri ile Belirlenmesi….	164
4.12.2.1.	*P. khinjuk* × *P. atlantica* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi…….....	164
4.12.2.2.	*P. khinjuk* × *P. khinjuk* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi……..	172
4.12.2.3.	*P. khinjuk* × *P. terebinthus* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi……..	180

4.12.2.4. *P. vera* × *P. atlantica* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi…….. 197

4.12.2.5. *P. vera* × *P. vera* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi….. 197

4.12.2.6. *P. vera* × *P. terebinthus* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi…….. 205

4.12.3. Somaklonal Varyasyon Analizlerinin Genel Değerlendirilmesi……... 213

5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 219

6. KAYNAKLAR…… 223

ÖZGEÇMİŞ…….. 265

ÖZET

MELEZ *Pistacia* L. GENOTİPLERİNİN KLONAL MİKROÇOĞALTIMI VE IRAP-ISSR MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Nazan ÇALAR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2018

Kontrollü tozlaştırma ile elde edilen melez *Pistacia* L. genotiplerinin tohumlarından gelişen sürgünlerden *in vitro* klonal mikroçoğaltım protokolleri tanımlanarak uzun dönem alt kültürü yapılmış olan melez genotiplerin genetik kararlılıkları IRAP ve ISSR moleküler belirteçleri ile belirlendi. *Pistacia* cinsine ait *P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. ve *P. atlantica* türlerinin erkek ve dişi kültürleri arasında kontrollü tozlaştırma ile tür içi ve türler arası 8 melez genotip üretildi. *P. khinjuk* × *P. khinjuk, P. khinjuk* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. atlantica, P. vera* × *P. terebinthus, P. vera* × *P. vera, P. vera* × *P. atlantica*, *P. terebinthus* × *P. terebinthus* ve *P. vera* × *P. khinjuk* genotiplerine ait tohumlardan *in vitro* kültür başlatmak için yüzey sterilizasyon teknikleri geliştirildi. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotipinin tohumlarının aksenik çimlendirilmesinde en iyi sonucu %10'luk sodyum hipoklorür içinde 15 dakika çalkalama süresi verirken, diğer melez genotiplerde en iyi çalkalama süresi 10 dakika olmuştur.

Kültür başlatma çalışmaları için kullanılan 1 mgl^{-1} BA ve bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamından 8 melez genotip arasında en yüksek çimlenme oranı %86.7 ile 1 mgl^{-1} BA içeren besi ortamında *P. vera* × *P. terebinthus* genotipinde elde edildi. *İn vitro* çimlenme çalışmaları sırasında çalışılan 8 melez genotip arasından antepfıstığına anaç olabilecek en iyi sonuçları veren *P. vera* × *P. vera, P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotiplerinin klonal çoğaltılması için tek bir eksplanttan itibaren ayrıntılı mikroçoğaltım yöntemleri geliştirildi. Klonal hatların rejenerasyonuna 1 mgl^{-1} BA içeren farklı besi ortamları (MS, WPM ve SH) arasında, ortalama 2.45 sürgün sayısıyla en iyi cevabı *P. vera* × *P. vera* ile MS besi ortamı vermiştir. Bu melez genotipler arasında sürgün proliferasyonuna 1 mgl^{-1} BA içeren farklı MS kuvvetlerinin (1/4, 1/2, 1/1, 2) etkileri incelenmiş; 2.60 sürgün sayısı, 17.75 mm sürgün uzunluğu ile 2 MS kuvveti besi ortamı kullanımının *P. vera* × *P. vera* genotipi için en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir. Melez klonların köklendirilmesi amacıyla farklı IBA konsantrasyonları arasından 8 mgl^{-1} IBA uygulaması en iyi sonucu vermiş, *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotipinde %40 oranında köklenme elde edilmiştir.

Sürgün uzunluklarının köklenme başarısı üzerine etkileri değerlendirildiğinde; 3 cm uzunluğundaki sürgünlerin *P. vera* × *P. vera, P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus* köklenmesinde (sırasıyla %40, %35 ve %35) en iyi sonucu verdiği ve *in vitro* köklendirilen melez klonların aklimatizasyonu için tam steril edilmiş torf kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Pistacia*, klonal anaç mikroçoğaltımı, ISSR, IRAP, somaklonal varyasyon.

Sürgün uzunluklarının köklenme başarısı üzerine etkileri değerlendirildiğinde; 3 cm uzunluğundaki sürgünlerin *P. vera* × *P. vera, P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus* köklenmesinde (sırasıyla %40, %35 ve %35) en iyi sonucu verdiği ve *in vitro* köklendirilen melez klonların aklimatizasyonu için tam steril edilmiş torf kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

Antepfıstığı ağaçlarına anaç olabilecek 6 melez genotipin (*P. khinjuk* × *P. khinjuk, P. khinjuk* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. atlantica, P. vera* × *P. terebinthus, P. vera* × *P. vera* ve *P. vera* × *P. atlantica*) *in vitro* çoğaltımı sonucu ortaya çıkabilecek olası somaklonal varyasyonlar 5 ISSR ve 7 IRAP primerleri ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, tez materyali olarak kullanılan 6 melez türün de mikroçoğaltımında 12 ayda ortalama düzeyde makul düzeyde polimorfizm gözlenmiştir ($0.25 \leqslant PIC \leqslant 0.5$). Bu sonuçlar melez *Pistacia* genotiplerinin klonal çoğaltılması için optimize edilen mikçoğaltım tekniğinin güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, melez *Pistacia* genotiplerinin mikroçoğaltılması ve altkültürlenmiş eksplantlarında doku kültüründen kaynaklı somaklonal varyasyonların belirlenmesi üzerine yapılan ilk çalışmadır.

ABSTRACT

CLONAL MICROPROPAGATION OF HYBRID *PISTACIA* L. GENOTYPES AND DETERMINATION OF GENETIC STABILITY WITH IRAP - ISSR MOLECULAR MARKERS

PhD THESİS

Nazan ÇALAR

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

2018

In vitro clonal micropropagation protocols were developed for seedlings derived from axenically germinated seeds of hybrid *Pistacia* L. genotypes obtained by controlled pollination. IRAP and ISSR molecular markers were used to test genetic stability in long-term micropropagated cultures of hybrid genotypes. 8 hybrid genotypes were produced from the inter- and intra-species of *P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. and *P. atlantica* by controlled pollination between the male and female genotypes of the *Pistacia* species. Surface sterilization techniques have been developed to the *in vitro* cultures from the seeds of the hybrid genotypes such as *P. khinjuk* × *P. khinjuk*, *P. khinjuk* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* × *P. atlantica*, *P. vera* × *P. terebinthus*, *P. vera* × *P. vera*, *P. vera* × *P. atlantica*, *P.terebinthus* × *P. terebinthus* and *P. vera* × *P. khinjuk*. The best shaking concentration for the axenic germination of the seeds of the *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotype was obtained in 10% sodium hypochlorite for 15 min, while the best maintaining time for other hybrid genotypes was 10 minutes.

The highest germination rate was 86.70% in the *P. vera* × *P.* terebinthus genotype among the 8 hybrid genotypes when the hybrid seeds were cultured in MS medium supplemented with 1 mgl-1 BA or without any plant growth regulator to the establishment of *in vitro* culture. Detailed micropropagation methods were described for the clonal propagation of three rootstock candidate *P. vera* × *P. vera*, *P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus* mong 8 hybrid genotypes which may be used as rootstock for pistachio, showing better development during *in vitro* germination studies. For the regeneration of clonal shoots, *P. vera* × *P. vera* gave the best results in terms of an average number of 2.45 shoots cultured on MS medium supplemented with 1 mgl^{-1} BA among different media (MS, WPM, and SH) tested. The effects of MS medium strength (1/4, 1/2, 1/1, 2/1) on shoot proliferation among the clones were investigated. The *P. vera* × *P. vera* gave the best result with the mean number of 2.60 shoots and with an average shoot length of 17.75 mm when the explants were cultured on a double strength MS medium supplemented with 1 mgl^{-1} BA.

Keywords: *Pistacia*, clonal rootstock micropropagation, ISSR, IRAP, somaclonal variation.

For rooting of hybrid clones, the 8 mgl^{-1} IBA treatment gave the best results among different IBA concentrations, and 40% rooting was obtained in the *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotype.

Three cm long shoots were found to give the best results in rooting *P. vera* × *P. vera*, *P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus* (40%, 35% and 35%, respectively) when the effects of shoot length on rooting success are evaluated. And the use of fully sterilized peat is appropriate for acclimatization of *in vitro* rooted hybrid clones.

6 hybrid genotypes that may be rootstocks to pistachio trees (*P. khinjuk* × *P. khinjuk*, *P. khinjuk* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* × *P. atlantica*, *P. vera* × *P. terebinthus*, *P. vera* × *P. vera* and *P. vera* × *P. atlantica*) were studied with 5 ISSR and 7 IRAP primers to identify possible somaclonal variations that may occur during *in vitro* propagation. Obtained data reveal that micropropagation of these hybrid genotypes showed "reasonable polymorphism" ($0.25 \leq PIC \leq 0.5$). These results showed that the optimized micropropagation techniques can be used safely for the clonal propagation of hybrid *Pistacia* genotypes. In conclusion, this is the first study on the micropropagation of hybrid *Pistacia* genotypes and the determination of somaclonal variations of subcultured explants during tissue culture.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge.2.1.	Dünyadaki antepfıstığı üretimi	12
Çizelge.2.2.	Antepfıstığının dünyadaki ihracat durumu	13
Çizelge.2.3.	Eksplant seçiminin somaklonal varyasyona etkileri	34
Çizelge. 3.1.	Temel MS besi ortamı içeriği	65
Çizelge. 3.2.	ISSR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	79
Çizelge.3.3.	ISSR reaksiyonunda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları	79
Çizelge 3.4.	ISSR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri	79
Çizelge 3.5.	IRAP reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	80
Çizelge.3.6.	IRAP AYF2 primeri ile amplifikasyon reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	80
Çizelge.3.7.	IRAP reaksiyonda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları	80
Çizelge.3.8.	IRAP AYF2 primeri ile yapılan reaksiyonda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları	81
Çizelge.3.9.	IRAP (2, 4, 5, 7, 9 ve 10 ve AYF2) primeri analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri	81
Çizelge.3.10.	Belirteç sistemlerinin ayrımlama kapasitelerini belirlemek için kullanılan yöntemler	82
Çizelge.4.1.	Melez *Pistacia* tohumlarının sterilizasyonu üzerine farklı NaOCI konsantrasyonlarının etkisi	84
Çizelge.4.2.	Melez *Pistacia* tohumlarının sterilizasyonu üzerine %10'lik NaOCI'de bekletme sürelerinin etkisi	86
Çizelge.4.3.	BBD içermeyen besi ortamında çimlendirilen melez tohumlardan gelişen fidanların özellikleri	92
Çizelge.4.4.	1 mg/l BA içeren besi ortamında çimlendirilen melez tohumlardan gelişen fidanların özellikleri	93
Çizelge.4.5.	Melez *Pistacia* genotiplerinin aklimatizasyonu	100
Çizelge.4.6.	Farklı besi ortamı tiplerinin melez antepfıstığı konlarının *in vitro* gelişmesine etkileri	113
Çizelge.4.7.	MS besi ortamının farklı kuvvetlerinin sürgün proliferasyonuna etkisi	116
Çizelge.4.8.	Sürgün proliferasyonuna farklı aminoasitlerin etkisi	119

Çizelge.4.9. Farklı karbonhidrat çeşitlerinin sürgün proliferasyonuna etkisi 122

Çizelge.4.10. Sürgün proliferasyonuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi 124

Çizelge.4.11. Sürgün proliferasyonuna farklı sitokinlerin etkisi 129

Çizelge.4.12. Sürgün proliferasyonuna farklı BA konsantrasyonlarının etkisi 133

Çizelge.4.13. *Klon-I* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi 136

Çizelge.4.14. *Klon-II* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi 137

Çizelge.4.15. *Klon-III* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi 137

Çizelge.4.16. *Klon-I* genotipinde sürgün proliferasyonuna farklı oksin tiplerinin etkisi 142

Çizelge.4.17. Sürgünlerin köklenmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi 143

Çizelge.4.18. Sürgünlerin köklenmesine sürgün uzunluğunun etkisi 145

Çizelge.4.19. Köklenmiş bitkilerin aklimatizasyonu üzerine farklı düzeylerde steril edilen torfun etkisi 156

Çizelge.4.20. 6 farklı *Pistacia* melezlerinin klonlarına ait gDNA miktar ve saflıkları 163

Çizelge.4.21. *P.khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 168

Çizelge 4.22. *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 168

Çizelge 4.23. *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi 169

Çizelge 4.24. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değeri 170

Çizelge 4.25. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değeri 170

Çizelge 4.26. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 175

Çizelge 4.27. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 176

Çizelge 4.28. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama

kapasitesi 177

Çizelge 4.29. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının benzerlik değeri 177

Çizelge 4.30. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının benzerlik değeri 178

Çizelge 4.31. *P.khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 184

Çizelge 4.32. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 184

Çizelge 4.33. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi 185

Çizelge 4.34. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değeri 186

Çizelge 4.35. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değeri 186

Çizelge 4.36. *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 192

Çizelge 4.37. *P. vera* × *P. atlantica* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 193

Çizelge 4.38. *P. vera* × *P. atlantica* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi 194

Çizelge 4.39. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değeri 194

Çizelge 4.40. IRAP primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değeri 195

Çizelge 4.41. *P. vera* × *P. vera* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 201

Çizelge 4.42. *P. vera* × *P. vera* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 201

Çizelge 4.43. *P. vera* × *P. vera* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi 202

Çizelge 4.44. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. vera* klonlarının benzerlik değeri 203

Çizelge 4.45. IRAP primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. vera* klonlarının benzerlik

değeri 203

Çizelge 4.46. *P.vera* × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri 209

Çizelge 4.47. *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi 210

Çizelge 4.48. *P. vera* × *P. terebinthus* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi 210

Çizelge 4.49. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değeri 211

Çizelge 4.50. IRAP belirteçleri kullanılarak *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değeri 211

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	*İn vitro* kültürde oksidatif patlamaların bir sonucu olarak mikroçoğaltılmış bitkilerde somaklonal varyosyon mekanizması	31
Şekil 3.1.	Çiçeklenme başlangıcına yakın çiçek gözü keselenmiş dişi ebeveyn	61
Şekil 3.2.	Kontrollü tozlaştırma yapılmış dişi ağaç	62
Şekil 3.3.	Kontrollü tozlaştırılma sonrası çiçek tomurcuğu	63
Şekil 3.4.	Kontrollü tozlaşma ile elde edilen melez tohumlar: **a)** *P. vera* × *P. atlantica,* ***b*****)** *P. vera* × *P. terebinthus,* ***c*****)** *P. vera* × *P. vera,* ***d*****)** *P. khinjuk* × *P. khinjuk,* ***e*****)** *P. vera* × *P. khnjuk,* ***f*****)** *P. khinjuk* × *P. terebinthus*	64
Şekil 4.1.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 7 gün sonra çimlenmiş tohumlar: **a)** *P. khinjuk* × *P. atlantica* tohumları, **b)** *P. khinjuk* × P. *khinjuk* tohumları, **c)** *P. vera* × P. *atlantica* tohumları, **d)** *P.vera* × P. *terebinthus* tohumları, **e)** *P. vera* × P. *vera* tohumları, **f)** *P. vera* × P. *khinjuk* tohumları	93
Şekil 4.2.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. khinjuk* bitkicikleri	94
Şekil 4.3.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. atlantica* bitkicikleri	95
Şekil 4.4.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. terebinthus* bitkicikleri	96
Şekil 4.5.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. vera* × *P. terebinthus* bitkicikleri	97
Şekil 4.6.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. vera* × *P. vera* bitkicikleri ve kök yapısı	98
Şekil 4.7.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez bitkicikler: **a)** *P. vera* × *P. atlantica* bitkileri, **b)** *P. terebinthus* × *P. terebinthus* bitkileri	99
Şekil 4.8.	1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında çimlendirilmiş alıştırma ortama aktarılmaya hazır köklenmiş 42 günlük *P. khinjuk* × *P. terebinthus* bitkileri	101
Şekil 4.9.	Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. terebinthus* bitkisi	102
Şekil 4.10.	Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. atlantica* bitkisi üstten görünümü	102
Şekil 4.11.	Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. atlantica* bitkisi	103
Şekil 4.12.	Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. vera* bitkileri	104

Şekil 4.13 Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. khinjuk* × *P. khinjuk* bitkileri 105

Şekil 4.14. Tek tohumdan çoğaltılmış *P. khinjuk* × *P. atlantica* sürgünleri 111

Şekil 4.15. Tek tohumdan çoğaltılmış *P. khinjuk* × *P. terebinthus* sürgünleri 111

Şekil 4.16. *Klon-I* genotipinin 50 mgl^{-1} aminoasit içeren MS besi ortamına aktarılan sürgün uçları: **a)** Valin destekli ortamdaki sürgünlerin gelişmesi, **b)** Lösin destekli sürgünlerin gelişmesi, **c)** Alanin destekli ortamdaki sürgünlerin gelişmesi 117

Şekil 4.17. **a)** *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonunun 28 gün sonunda triptofan aminoasitli ortamadaki gelişim durumu, **b)** 28 gün sonunda alanin aminoasitli ortamdaki sürgünlerin gelişim durumu, **c)** 28 gün sonunda valin aminoasitli ortamdaki sürgünlerin gelişim durumu 121

Şekil 4.18 *Klon-I* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz, **b)** 30 g sukroz, **c)** 40 g sukroz, **d)** 60 g sukroz 125

Şekil 4.19. *Klon-II* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz, **b)** 30 g sukroz, **c)** 40 g sukroz, **d)** 60 g sukroz 125

Şekil 4.20. *Klon-III* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz, **b)** 30 g sukroz, **c)** 40 g sukroz, **d)** 60 g sukroz 126

Şekil 4.21. *Klon-I* genotipinde farklı sitokinin çeşitlerinin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 1 mgl^{-1} BA, **c)** 1 mgl^{-1} Zeatin, **d)** 1 mgl^{-1} Kinetin, **e)** 1 mgl^{-1} 2iP, **f)** 1 mgl^{-1} TDZ 128

Şekil 4.22. *Klon-II* genotipinde farklı sitokinin çeşitlerinin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz **b)** 1 mgl^{-1} Kinetin, **c)** 1 mgl^{-1} Zeatin, **d)** 1 mgl^{-1} BA, **e)** 1 mgl^{-1} TDZ, **f)** 1 mgl^{-1} 2iP 130

Şekil 4.23. *Klon-III* genotipinde farklı sitokininlerin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 1 mgl^{-1} B, **c)** 1 mgl^{-1} 2iP, **d)** 1 mgl^{-1} Kinetin 131

Şekil 4.24. *Klon-I* genotipinde farklı BA konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 0.5 mgl^{-1} BA, **c)** 1 mgl^{-1} BA, **d)** 2 mgl^{-1} BA, **e)** 4 mgl^{-1} BA, **f)** 8 mgl^{-1} BA 134

Şekil 4.25. *Klon-II* genotipinin **s**ürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi: **a)** 0.5 mgl^{-1} BA, **b)** 1 mgl^{-1} BA, **c)** 2 mgl^{-1} BA **d)** 4 mgl^{-1} BA, **e)** 8 mgl^{-1} BA 135

Şekil 4.26. *Klon-I* genotipinin köklenmesi üzerine 28 günlük kültürlere: **a)** NAA'in etkisi, **b)** IBA'nın etkisi 142

Şekil 4.27. *Klon-III* 4 mgl^{-1} IBA konsantrasyonunda kök gelişimi 144

Şekil 4.28. *Klon-I* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi: **a)** 1 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi, **b)** 1 cm uzunluğundaki

sürgün uçlarının köklenmesi **c)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi, **d)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi, **e)** 3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi, **f)** 3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi, **g)** 4 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi, **h)** 4 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi 146

Şekil 4.29. *Klon-II* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi 147

Şekil 4.30. **a)** *Klon–II* genotipinde 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi, **b)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenme durumu 148

Şekil 4.31. *Klon-III* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi: **a)** 1 cm sürgün uzunluğundaki köklenme durumu, **b)** 2 cm sürgün uzunluğundaki köklenme durumu, **c)** 3 cm sürgün uzunluğundaki köklenme, **d)** 4 cm sürgün uzunluğundaki köklenme 149

Şekil 4.32. *Klon-III* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi 150

Şekil 4.33. *Klon-I* bitkisinin aklimatizasyon sonrası 42. gün 157

Şekil 4.34. *Klon-I* bitkisinin aklimatizasyon sonrası 42. gün 158

Şekil 4.35. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *Klon-II* bitkileri 159

Şekil 4.36. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *Klon-III* bitkileri 160

Şekil 4.37. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 164

Şekil 4.38. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 165

Şekil 4.39. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 165

Şekil 4.40. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 166

Şekil 4.41. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**:

5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 166

Şekil 4.42. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 167

Şekil 4.43. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 167

Şekil 4.44. **A.** ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram 171

Şekil 4.45. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram 171

Şekil 4.46. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 172

Şekil 4.47. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 173

Şekil 4.48. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profili (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 173

Şekil 4.49. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği, K12-1: 12. ayın 1. örneği, K12-2: 12. ayın 2. örneği 174

Şekil 4.50. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 174

Şekil 4.51. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 174

Şekil 4.52. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 175

Şekil 4.53. **A.** ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. khinjuk* X *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 179

Şekil 4.54. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 179

Şekil 4.55. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 180

Şekil 4.56. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 181

Şekil 4.57. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR profili (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 181

Şekil 4.58. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* IRAP profili (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 182

Şekil 4.59. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 182

Şekil 4.60. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P.*

terebinthus IRAP (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 183

Şekil 4.61. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 173

Şekil 4.62. **A.** ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. khinjuk* X *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 187

Şekil 4.63. ISSR ve IRAP primerleri primerleri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 188

Şekil 4.64. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 189

Şekil 4.65. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 189

Şekil 4.66. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 190

Şekil 4.67. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 190

Şekil 4.68. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 191

Şekil 4.69. IRAP-9 (sol) IRAP10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği,

K12-1: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 191

Şekil 4.70. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 192

Şekil 4.71. **A.** ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 196

Şekil 4.72. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin

UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 196

Şekil 4.73. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 197

Şekil 4.74. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 198

Şekil 4.75. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 198

Şekil 4.76. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 199

Şekil 4.77. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 199

Şekil 4.78. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 200

Şekil 4.79. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 200

Şekil 4.80. **A.** ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. vera* X *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 204

Şekil 4.81. ISSR ve IRAP primerleri *P. vera* × *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 204

Şekil 4.82. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 205

Şekil 4.83. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 206

Şekil 4.84. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* SSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 206

Şekil 4.85. IRAP-2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 207

Şekil 4.86. IRAP-4 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 207

Şekil 4.87. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 207

Şekil 4.88. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder

DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 208

Şekil 4.89. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği 208

Şekil 4.90. **A.** ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram, **B.** IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 212

Şekil 4.91. ISSR ve IRAP primerleri *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram 212

KISALTMA VE SİMGELER

A : Alderson
AAT : Aspartate Amino Transferase
AFLP : Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
BA : Benzyladenin
BAP : 6-benzylaminopurine
BBD : Bitki Büyüme Düzenleyici
Bç : Baz Çifti
BSAA : 3- Benzo(b)selenyl Acetic Acid
Ca : Kalsiyum
cm : Santimetre
CTAB : Setil Trimetil Amonyum Bromid
d : Dakika
DKW : Driver ve Kuniyuki
DNA : Deoksiribonükleikasit
dNTP : Deoksinükleosid Trifosfat
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
FAO : Gıda ve Tarım Örgütü
FAO : Food and Agriculture Organization
Fe : Demir
fi : Bir Bantın Varolma Sıklığı
G5 : Gamborgh's B-5
GA_3 : Gibberellik Asit
gDNA : Genomik Deoksiribonükleikasit
GNH : Garoosi, Nezami ve Haddad Besi Ortamı
gl^{-1} : Gram/litre
GPI : Glucose-6-Phosphate İsomerase
HCI : Hidroklorikasit
$HgCI_2$: Civa Klorür
IAA : İndol-3 Asetik Asit
IBA : İndol-3 Butirik Asit
INC : UIuslararası Sert Kabuklu ve Kuru Meyve Konseyi
IRAP : Retrotranspozon Arası Çoğaltılmış Bölge Polimorfizm

ISSR : Basit Ara Dizi Tekrarları

K : Knop

K : Kinetin

KCl : Potasyum Klorür

KOH : Potasyum Hidroksit

LS : Linsmaier ve Skoog

LTR : Uzun Uç Doğrudan Tekrarları

M : Molar

m : Metre

m^{-2} s^{-1} : Metrekare/Saniye

MAS : Belirteçe Bağlı Seleksiyon

mg : Miligram

$MgCl_2$, : Magnezyum Klorür

mgl^{-1} : Miligram/litre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

MS : Murashige ve Skoog

MSAP : Amplifiye Polimorfizme Duyarlı Metilasyon

NAA : α-Naftalen Asetik Asit

NaCI : Sodyum Klorür

NaOCl : Sodyum hipoklorit

nL : Toplam Lokus

nm : Nanometre

nM : Monomorfik Lokus

nP : Polimorfik Lokus

PBU : Sentetik Fenilüre Türevleri

PCR (PZR) : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PG *: P. atlantica* ve *P. integerrima*

PG II *: P. integerrima* × *P. atlantica*

PIC : Polimorfik Bilgi İçeriği

PIC*i* : *i* Bantının Polimorfik Bilgi İçeriği

Picloram : 4-amino-3,5,6- trikloropikolinik asit

pP : Polimorfik Lokus Oranı

PSI : Kareye Pound Cinsinden Uygulanan Kuvvet

PVP : Polivinilprolidon

R1	: 1.Kuşak
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
REMAP	: Retrotranspozon ve Mikrosatellit Çoğaltılmış Bölge Polimorfizm
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
ROS	: Reaktif Oksijen Türlerinin
rpm	: Dakikadaki Döngü Sayısı
SCAR	: Dizi Tanımlı Çoğaltılmış Bölgeler
SH	: Standart Hata
SH	: Schenk and Hildebrandt
sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizm
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı)
SRAP	: Dizi bağlı çoğaitılmış polmorfizm
SSAP	: Sequence-specific amplified polymorphizm
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
TA	: Bağlanma Sıcaklığı
TCL	: İnce Hücre Katmanı Kültürü
TDZ	: Thidiazuron
TOBB	: Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği
Trademap	: Uluslararası Ticaret Merkezi
Tris-HCl	: 2-amino-2-hidrokismetil-1,3-propandiol-hidroklorikasit
TTC	: Triphenyl Tetrazolium Chloride
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UCB-I	: *P. atlantica* × *P. integerrima*
UPGMA	: Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Average
UV	: Ultraviyole
w	: Watt
w/v	: Ağırlık/Hacim
WPM	: Woody Plant Medium
WPM	: Woody Plant Medium (Lloyd ve McCown
Z	: Zeatin
µg/µl	: Mikrogram/Mikrolitre

μm	: Mikrometre
μmol	: Mikromol
°C	: Santigrat Derece
2,3-MDPU	: Sentetik Fenilüre Türevleri
2,4 D	: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2,4,5-T	: 2,4,5-Triklorofenoksi Asetik Asit
2iP	: 6-Dimetylaminopurine
4-CPPU	: Sentetik Fenilüre Türevleri

1. GİRİŞ

Tarım ülkesi olarak bilinen Türkiye'de sektörün yıllardır süregelen sorunları (arazilerin küçük/parçalı olması, uygun sayıda/fiyatta işçi bulunamaması, ürün fiyatlarının düşük olması aracı/pazarlama, girdilerde pahalılık/dışa bağımlılık, tarım politikalarının istikrarsız olması vs.) varlığını sürdürmekte olup, verim düşüklüğünün temel nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Tarım arazilerinin miras yoluyla küçülmesi, sulama ve makineli tarıma geçişin yetersiz olması, üretimin daha çok doğal şartlara bağlı olarak sürdürülmesi, girdi maliyetlerinin yüksek olması, üretici ve tüketici arasındaki aracıların fazla olması başlıca sorunlar olarak görülmektedir.

Türkiye'de toplam arazinin %24.5'i sürdürülebilir kaliteli topraklardan meydana gelmektedir. Bu kaliteli toprak sınıfı içinde %90 tarımsal alanların olduğu arazilerdir. 77.9 milyon hektar olan toprak varlığımızın 26.3 milyon hektarlık alanını tarım arazileri oluşturmaktadır (**TOBB 2014**).

Türkiye, bahçe bitkileri yetiştiriciliği için uygun iklim koşullarına sahiptir. Dünyadaki gen merkezleri arasında bulunması nedeniyle (Yakındoğu ve Akdeniz bölgelerini kapsaması) birçok bitki ve hayvan tür ve çeşidinin gen merkezi konumundadır. Hali hazırda yeryüzünde kültürü yapılmakta olan 138 meyve çeşidi arasında 75 kadar türün tarımını gerçekleştirmekteyiz (**Gülcan ve ark. 2000**).

Türkiye'de yetiştirilen meyveler dünya pazarında aranan türlerdir. Ülkemizde meyvecilik genellikle sulanabilen arazilerde yapılmaktadır. Sulu arazilerin ortalama %11'inde meyvecilik yapılmakta olup, bu alandan yaklaşık 15 milyon ton ürün elde edilmektedir. 2015 yılında meyve ürünleri, içecek ve baharat bitkileri üretiminde %3.9'luk bir artış yaşanırken, 2016 yılında bu oran %6.3'e çıkmıştır. Üretim miktarı ise 18.887.625 ton olarak gerçekleşmiştir (**TÜİK 2016**). Bu üretim kapasitesi ile ülkemiz dünya toplam meyve üretiminin %3'ünü karşılamaktadır. Ülkemizde fazla sayıda meyve türünün yetişiyor olmasının nedeni değişik iklim koşullarının varlığıdır. Birçok meyve türünün üretiminde ve dış ticarette ilk sırada yer alan ülkemiz, bazı türler açısından belirtilen verim değerlerine göre başka ülkelere kıyasla oldukça gerilerde kalmaktadır.

Ülkemizde çok eski zamanlardan beri antepfıstığı üretimi söz konusu olmasına rağmen verim düşüklüğü, yetiştiricilik için gerekli yeterliliklerin yerine getirilmemesi

ve dolayısıyla meyvelerin homojen bir yapıda olmaması ve çıtlama oranının düşük olması gibi nedenlerden dolayı hem üretim hem de pazarlama açısından çeşitli sorunlarla karşılaşmaktayız. En önemli sorunların başında antepfıstığı yetiştiriciliğinin sulak koşullar yerine tamamen kuru koşullarda ve genellikle taşlı ve meyilli arazilerde yapılıyor olmasıdır. Buna karşın, antepfıstığı üretiminde ilk sıraları paylaşan İran ve özellikle Amerika Birleşik Devletleri'ndeki antepfıstığı bahçelerinin büyük bir kısmında fungus ve nematodlara karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiş melez klonal anaçlar kullanılması ve ayrıca yetiştiriciliğin verimli arazilerde ve sulu koşullarda yapılıyor olmasıdır.

Ülkemiz antepfıstığının önemli gen merkezlerinden biridir. Akdeniz, Ege ve hatta İç Anadolu Bölgesi olmak üzere Türkiye'nin 44 ilinde antepfıstığı yetiştiriciliğine rastlanmakta beraber ağırlıklı olarak üretim Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılmaktadır. Üretimde en çok söz sahibi olan iller Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Mardin, Kilis, Diyarbakır ve Siirt'tir. 1948 yılında Ceylanpınar Devlet Çiftliği ile ülkemizde antepfıstığı yetiştiriciliği profesyonel olarak 114 dekar arazi üzerinde başlamıştır. Günümüzde bu kurum antepfıstığı araştırmaları için 43 bin dekarlık bir alanda antepfıstığı için çok önemli araştırmalara ev sahipliği yapmaktadır. Ülkemiz antepfıstığı ağaç varlığının %90'ı Gaziantep, Şanlıurfa, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Siirt'te yer almaktadır. Antepfıstığı sıcak, soğuk ve kuraklığa dayanıklı bir bitkidir. Bu özelliği nedeniyle, taşlık, besin maddelerince yoksul ve kireçli topraklarda yetişebilmektedir. Ayrıca, yağış miktarının az (300-500 mm), sulama suyunun sınırlı ve kültür bitkileri bakımından ekonomik olarak bakılmayan topraklarda bile antepfıstığı yetiştirilebiliyor olması hem ülkemiz ve çiftçimiz ekonomisi açısından büyük kazançtır. Dünya'da üretilen toplam antepfıstığı miktarı 2012 yılı itibariyle yaklaşık 150 bin ton üretimle üçüncü sırada yer alan ülkemiz 2016 yılında 170 bin tona yükselmiş olup Türkiye Ziraat Odaları Birliği açıklamasına göre ikinci sıraya yükselmiştir (**TÜİK 2017**). 2015 yılında sert kabukluların üretim hacmi %9.5'lik yükseliş gösterirken, bu oran 2016 yılında %5.4'lik düşüşle kapatmıştır. Antepfıstığı üretiminde 2015 yılında rekor düzeyde gerçekleşen artış, hız kesmemekle birlikte devam etmiş %18.1 olarak gerçekleşmiştir. Türkiye genelinde antepfıstığı üretimi 2014-2016 yılları ortalamasına göre yaklaşık 132.000 ton olarak gerçekleşmiştir. (**TÜİK 2017**).

Ülkemizde tesis edilen antepfıstığı bahçelerinde açık tozlanma sonucu elde edilen tohumlardan üretilen çöğürler anaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, ülkemizde antepfıstığı fidan talebi hala yeterli ölçüde karşılanamadığı için yetiştiricilerin büyük kısmı bahçeyi anaçlarla tesis edip, birkaç yıl bekleyip aşılama kalınlığına gelen çöğürlere aşılama yapmaktadır. Bu durum bahçenin verime yatma zamanının uzamasına neden olmaktadır. Bu zaman kaybı antepfıstığı yetiştiriciliğinin gelişmesini etkileyen en önemli faktördür. Diğer bir ifadeyle, antepfıstığı fidanı üretiminde kullanılan geleneksel yöntemler talepleri karşılamada belirgin bir şekilde yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda aşı kalınlığına daha erken gelen, aşılandığı kültür çeşidi ile uyumsuzluk göstermeyen, daha verimli, çıtlama oranı yüksek kaliteli meyve üretimini sağlayan ve periyodisite eğilimi az olan ya da göstermeyen melez anaçlara ihtiyaç olduğu kaçınılmaz bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Üzerinde yaşadığımız Mezopotamya topraklarında yazılı kaynaklara göre binlerce yıldır antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı tespit edilmiştir. Ancak bugün ülkemizde verimde olan antepfıstığı ağaçlarının yaş ortalaması 40'a bile varmamaktadır. Antepfıstığında "Meyve veren yaştaki ağaçların yaş ortalaması niçin düşüktür?" sorusunun cevabı (**klonal anaç kullanılmamasıdır**) net olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumun mevcut üretim sorunlarının çözümü için bir başlangıç noktası olması muhtemeldir.

Gerek ülkemizde gerekse antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı diğer ülkelerde melez klonal anaçların *in vitro* mikroçoğaltımı için çok az sayıda araştırma sonucu rapor edilmekle beraber, özellikle ABD'de bazı ticari firmalar tarafından hali hazırda klonal anaçların kitlesel üretiminin yapıldığı bilinmektedir **(Anonim 2018)**. Ülkemizde antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde kullanılabilecek ekolojik koşullara uyumlu anaçların belirlenmesi için çalışmalar yapılıyor olmasına ve bazı uygun sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen, yeni tesis edilen bahçelerde halen anaç olarak tohumdan yetiştirilen çöğürler kullanılmakta ve tescilli anaç üretimi yapılmamaktadır. Farklı *Pistacia* türleri ve antepfıstığı çeşitleriyle ilgili çok sayıda *in vitro* çalışma rapor edilmesine rağmen, ülkemiz ekolojik koşullarına özgü melez anaçların elde edilemediğini ifade etmek gerekir. Bundan dolayı da ister fidanlık koşullarında ister *in vitro* şartlardaki çoğaltımıyla ilgili herhangi bir çoğaltım protokolünün rapor edilmediği bir gerçektir.

Ülkemiz antepfıstığı üretiminde istenilen seviyelere ulaşamamış ve yoğun üretime geçememiştir. Bu durumun başlıca nedenleri arasında;

-Antepfıstığının diğer meyve türlerinin yetişemeyeceği kötü toprak koşullarında yetiştirileceği kanısının yaygın olması nedeni ile yetiştiriciliğin tamamen kuru koşullarda ve çoğunlukla kıraç, taşlık ve meyilli arazilerde yapılması

-Kötü koşullarda yetiştirilen antepfıstıklarının gençlik kısırlık dönemlerinin uzun olması

-Yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerimizin mutlak periyodisiteye daha yatkın olması ve özellikle üstün nitelikli tozlayıcı erkek çeşitlerin bulunmayışıdır.

Bu sorunlar yüzünden üreticiler birinci sınıf arazilerde antepfıstığı yetiştirmeye yönelmemektedir. Günümüz teknolojileri kullanılarak seçkin klonal anaç ve kültür çeşitlerinin kullanılması yoluyla üretim miktarımızın arttırılması mümkün görülmektedir.

Klonal anaçlar;

-genotipin devamlılığını sağlaması,

-homojen popülasyon oluşturması,

-kolaylıkla çoğaltılabilmesi,

-iklim koşullarına daha kolay uyum sağlaması,

-gençlik kısırlık döneminin daha kısa sürmesinden dolayı erken meyveye yatması,

-istenilen özelliklerinin bir bitkide toplanmasına olanak sağlaması,

-gelişme dönemlerinin kontrol edilebilmesi (anaç/kalem uyuşma durumu, gelişme kuvvetleri, meyve vermeye başlama zamanları, meyvelerin kaliteleri, raf ömürleri, ekolojik ve fizyolojik isteklerinin bilinmesi) olmak üzere bir takım kullanım önceliklerine sahiptir (**Yılmaz 1992; Hartmann ve ark. 1997**).

Antepfıstığı bahçelerinin kurulması amacıyla uygun çeşitlerin hızlı çoğaltımı için kullanılan geleneksel yöntemler talepleri karşılamada belirgin bir şekilde yetersiz kaldığı açıktır. Bununla birlikte; aşılama kalınlığına daha erken gelen, aşılandığı kültür

çeşidi ile uyuşan, verimli, çıtlama oranı yüksek ve iri taneli meyve üretimine neden olan ve periyodisite eğilimi az olan ya da göstermeyen anaçlara ihtiyaç vardır. Bitki hücre, doku ve organ kültür teknikleri (organogenez, embriyogenez, mikroaşılama) geleneksel yöntemler ile çoğaltıma alternatif yaklaşımlar getirmektedir. Antepfıstığı ve anaçları üzerine çeşitli araştırmacılar tarafından bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak başarılı araştırma sonuçları elde edilmesine rağmen antepfıstığı anaçlarının ticari mikroçoğaltımı için laboratuvardan bahçeye bütünleşmiş bir çoğaltım yöntemi bugüne kadar rapor edilmemiştir (**Onay 2012**). Bu nedenle, antepfıstığının çoğaltımı için geliştirilecek melez bitkilerin hızlı üretimi için güncel biyoteknolojik çoğaltım yöntemlerinin uygulanması bu tez çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

İn vitro teknolojiler biyoloji alanında sürekli artmaktadır. Bitki doku kültüründe çok geniş bu alan içinde sadece bir başlık olmuştur. Başlangıçta bitki hücre kültürleri ya kök gibi organlardan ya da organize olmamış kitlelerden başlatılabilmesi mümkün iken, şimdi ise tek tek yani bireysel olarak (tek bir hücre ile mikrokültür sistemi), topluca (büyük ölçekli fermenterlerde, Erlenmayer şişelerinde ya da petri kaplarında süspansiyonlar veya kalluslar gibi) ya da sürgün, kök, ovul, çiçek, meyveler gibi organize olmuş birimler gibi çeşitli organlarla bitki hücre kültürü başlatılabilinmektedir (**George 1993**). *İn vitro* kültür sistemleri ilk olarak, bitki hücre bölünmesi, büyümesi, farklılaşması, fizyolojisi ve biyokimyası üzerinde temel araştırmalar ve çalışmalar için deneysel araçlar olarak geliştirilmiştir (**Street 1974**).

Klonal çoğaltımın asıl amacı; çoğaltılacak bitkinin anaç bitki ile aynı genetik yapıda olmasını muhafaza etmektir. Bu amaçla kullanılan *in vitro* teknikler mikroçoğaltım teknikleri olarak tanımlanmaktadır. Bitki doku kültürü tarımsal üretim ve ıslah araştırmalarının temel araçlarından biri haline gelmiş olup, bitkisel kaynaklarının üretimi, korunması ve iyileştirilmesinde yoğun olarak faydalanılmaktadır. Bitki doku kültüründen üretilmiş olan bitki klonlarında somaklonal varyasyonun varlığı doku kültürü kullanımını olumsuz olarak etkileyen bir sorun olarak kalmaya devam etmektedir. *İn vitro* kültürde çoğaltılmış hücre klonlarının genetik değişiklik gösterebileceği **Braun** (**1959**), tütün bitkisinin 5 yıllık *in vitro* kültürleri ile yaptığı çalışmada rapor edilmiştir. Genetik farklılıklar somatik hücrelerin rejenerasyonundan köken alan bitkiler arasında (**Larkin ve Scowcroft 1981**) ve onların kuşaklarında oluşabileceği rapor edilmiştir (**Edallo ve ark. 1981; Evans ve Sharp 1983; Buiatti ve**

ark. 1985). Somaklonal varyasyon: hücre ve doku kültürlerinden kaynaklı varyasyonlar olarak tanımlanmıştır. Ancak bu durum bir yandan yeni geliştirilmek istenen bitki tür ve çeşitleri için genetik kaynakların artmasına vesile olmaktadır (**Larkin ve Scowcroft 1981**). Somaklonal varyasyon hücre ve doku kültürlerinden kaynaklı varyasyonlar olarak tanımlanmıştır. Bu durum yeni geliştirilmek istenen bitki tür ve çeşitleri için genetik kaynakların artmasına vesile olmaktadır. Somaklonal varyasyon terimi ilk kez 1981 yılında doku kültürü yoluyla elde edilen şeker kamışı bitkilerinin incelenmesiyle kullanılmıştır (**Larkin ve Scowcroft 1981**). Somaklonal varyasyon terimi doku kültüründen türemiş klonların tüm formları için evrensel olarak kullanılmaktadır (**Bajaj 1990**). Fakat protoklonal, gametoklonal ve meriklonal varyasyonlar gibi diğer isimlerde protoplast, anter ve meristem kültürlerinden kaynaklı varyasyonları tanımlamada kullanılmaktadır (**Karp 1994; Chen ve ark. 1998**). Bazı bilim insanları bu tanıma başka bir bakış açısıyla somaklonal varyasyonun eşeyli döngü yoluyla kalıtsal olması gerektiğini ifade etmişlerdir. Ne yazık ki; karmaşık eşey uyuşmazlıkları, tohumsuzluk, poliploidi ve uzun rejenerasyon döngülerinden dolayı kalıtılabilirliğini göstermek her zaman mümkün olmaması nedeniyle bitkilerdeki bu tür somaklonal varyasyonların kalıtım doğasını açıklamak zor ve neredeyse imkansız olarak görünmektedir (**Skirvin ve ark. 1994**).

Yapılan tüm mikroçoğaltım işlemleri sırasında, ana bitki ile onun klonları arasında oluşabilecek somaklonal varyasyon, genetik değişiklik riski taşır (**Larkin ve Scowcroft 1981**). Somaklonal varyasyonun varlığına dair ilk çalışmaların yayınlanmasından (**Braun 1959**) bu yana, somaklonal varyasyon hala birçok mikroçoğaltımı yapılan bitki için en büyük problemlerden birisidir (**Bairu ve ark. 2011**). Bitki hücrelerinin *in vitro* kültürde büyümesi ve tam bir bitkiye dönüşmesi vejetatif (eşeysiz) çoğaltım işlemi olup, yalnızca hücrenin mitoz bölünmesini içerir ve teorik olarak herhangi bir varyasyona yol açmaz (**Bairu ve ark. 2011**). Doku kültüründe en çok istenen durum elbette genetik olarak homojen bitkilerin elde edilmesidir (**Larkin 1998**). Doku kültürü çalışmaları süresince, kontrol edilemeyen ve rastgele gelişen varyasyonlar beklenmedik ve çoğunlukla da istenilmeyen bir oluşumdur (**Karp 1994**). Tüm bu olumsuz özelliklerine rağmen, somaklonal varyasyon yeni özelliklere sahip bitki türlerinin gelişimi için ise istenen bir durumdur **(Buiatti 1994; Mehta ve Angra 2000**). Uzun süre alt kültüre alınmış bitkilerde somaklonal

varyasyonun oluştuğuna dair birçok çalışma kaydedilmiştir (**Reuveni ve Israeli 1990; Petolino ve ark. 2003**).

Mutasyonlar genetik ayrışma ve rekombinasyonlardan türetilmemiş DNA dizilerindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (**Van Harten 1988**). Mutantlarda genetik varyasyon ya fiziksel ve kimyasal mutajenlerle özel bir muamele ile ya da doku kültürü besi ortamlarında kullanılacak kimyasal maddeler tarafından uyarılabilir (**Predieri 2001; Roux ve ark. 2004**).

Somaklonal varyasyonların varlığı; morfolojik, fizyolojik/biyokimyasal ve moleküler tekniklerle belirlenebilir. Moleküler belirteçler iki ya da daha fazla birey arasında özel dizi farklılıklarının belirlenmesine izin veren belirteçlerdir. Gen etiketleme, genetik haritalama, tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler, belirteçler yardımıyla seçim (MAS) çalışmaları polimer zincir reaksiyonunun (PCR) keşfinden sonra kolaylaşmıştır (**Joshi ve ark. 2000**).

Yukarıda belirtilen açıklamalar ışığında sunulan **bu tez çalışmasının temel amacı**, klasik melezleme ile elde edilecek kültür ortamında iyi gelişen melez genotiplerin hızlı çoğaltımı için tüm mikroçoğaltım basamaklarının optimize edilerek, sürekli olarak kullanılabilecek bütünleşmiş çoğaltım protokolleri geliştirilmesidir. Ayrıca melezleme ile elde edilecek dört farklı türe ait erkek ve dişi anaç genotipler ile bu anaçların ikili melez kombinasyonları materyal olarak kullanılıp *in vitro* rejenere edilmiş klonal materyallerin genetik kararlılıkların moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. **Bu kapsamda tez çalışmasında, Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü koleksiyon bahçesinde bulunan buttum (*P. khinjuk* Stocks), antepfıstığı (*P. vera* L.), melengiç (*P. terebinthus* L.) ve Atlantik sakızının (*P. atlantica* Desf.) erkek ve dişi genotipleri arasında;**

(i) **hem tür içi hem de türler arası kontrollü tozlanma ile melez tohum eldesi,**

(ii) **üretilen melez genotiplerin *in vitro* çimlenme kapasitelerinin belirlenmesi,**

(iii) ***in vitro* çimlenme ortamında en iyi gelişme özelliği gösteren melez genotiplerin klonal mikroçoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesi,**

(iv) ISSR ve IRAP moleküler belirtecleri kullanılarak *in vitro* çoğaltımları gerçekleştirilecek melez genotiplerin genetik kararlılıklarının belirlenmesi araştırmaları yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda; melez genotiplerin morfolojik özellikleri, *in vitro* çimlenme kapasiteleri ortaya konulacak, *in vitro* mikroçoğaltım yöntemleri belirlenecek, mikroçoğaltım sonucu somaklonal varyasyonun olup olmadığı tespit edilecektir. Bu tezden elde edilen sonuçlar ışığında melez germplazmlarda genetik kayba uğramadan orta ve uzun süreli saklanabilecek ve standart anaçlardan daha iyi performans gösteren genotipler yeniden rejenere edilerek, yoğun fidan üretimi için kullanılabilmesine olanak sağlayacaktır. Tüm bunların yanı sıra, çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ileride yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere anaç üretimi için gen havuzunun tanımlanması söz konusu olacaktır.

Bu tez çalışmasında tür içi ve türler arası melez üretimi Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde, mikroçoğaltım çalışmaları ise Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda ve genetik fidelite çalışmaları Gebze Teknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen bilgiler, antepfıstığı ıslahında nitelikli yeni Ar-ge projelerinin üretilmesine olanak sağlayacak ve ülkemizde gelecekte yapılacak olan benzer çalışmalara öncülük edecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Pistacia* spp.

2.1.1. Orjini ve Tarihçesi

Anacardiaceae familyası tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde ağaç ve çalı formunda yetişen 70'den fazla cins ve 600 türü içerir (**Mitchell ve Mori 1987; Wannan 2006**). *Pistacia* cinsi *Anacardiaceae* familyasının *Spindales* takımının bir üyesidir (**Stevens 2008**). Aynı zamanda mahun cevizi, mango, biber ağacı, sumak, kaju, sarı mombin, kırmızı mombin, imbu gibi türler de bu familyanın içerisinde yer almaktadır. Bu cins içinde ekonomik olarak önemli bir yere sahip olan antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) olmuştur. Yenilebilir meyvelerinden dolayı gıda endüstrisinde ticari olarak büyük öneme sahip olmuştur. *Pistacia vera* sadece ticari olarak yetiştirilmez aynı zamanda geri kalan türler içinde en fazla anaç olarak kullanılan türdür (**Hormaza ve Wünsch 2011**). Yabani olarak yetişen diğer türler ve bu türlerin tohumları anaç üretimi amacıyla tohum kaynağı olarak kullanılmış olmakla birlikte zaman zaman sabun üretiminde ve farklı amaçlar için yağlarının çıkarılması yoluyla da tüketilmişlerdir. *Pistacia* cinsine ait ağaçların anavatanı Suriye'den Afganistan ve Kafkasya'ya, Batı ve Küçük Asya'ya uzanır. Türkiye'deki arkeolojik çalışmalar M.Ö. 7000 yılında bile bu türün besin maddesi olarak kullanıldığını göstermektedir. Antepfıstığı M.S. ilk yüzyılın başlarında Suriye'den İtalya'ya geçmiş daha sonra Akdeniz ülkelerine yayılmıştır. Bu türü Amerika Birleşik Devletleri'ne ilk getiren kişi 1854 yılında Charles Mason olup tohumlarını Kalifornia, Teksas ve bazı güney eyaletlere deneme amaçlı ekmiştir. 1875 yılında Fransa'dan ithal edilen birkaç küçük antepfıstığı ağacı, Kalifornia'nın Sonoma şehrine dikilmiştir. 1900'lü yılların başlarında ABD Tarım Bakanlığı *Pistacia* türlerini ve antepfıstığı çeşitlerinin bir koleksiyonunu Chico Kalifornia'da Plant Introduction Station da (Bitki Alıştırma İstasyonu) toplamıştır. Ticari olarak antepfıstığı üretimi 1970'li yılların sonunda başlamış ve San Joaquin vadisinde büyük bir üretim dalgası ile yayılmıştır (**Anonim 2017**). Diğer önemli antepfıstığı üreticisi ülkelerin başında İran ve Türkiye gelmektedir. Eğer Türkiye'de antepfıstığı üretimi için varolan çeşitli sorunların çözümüne yönelik yeterli önlemler alınmazsa ve tescilli klonal anaçlar kullanılmazsa dünyadaki üretimde ikincilik ve üçüncülük arasında değişen sıralamasını Çin'e kaptırması muhtemel görünmektedir. *Pistacia* cinsi içerisinde tanımlanmış 9 tür ve 5

alttür olmak üzere 14 tür bulunmaktadır (**Al-Saghir ve Porter 2012**). Bu türler 8 - 10 metre yüksekliğinde, dioik, herdemyeşil, güzel ve egzotik ağaçlardır (**Al-saghir 2009**). *Pistacia* cinsine giren türler iki evcikli (dioik) olup dişi ve erkek çiçekler farklı ağaçlar üzerinde bulunmaktadır. Tozlanma rüzgâr aracılığıyla olmaktadır (**Crane ve Iwakiri 1981**). *Pistacia* türleri normalde iki evcikli olmalarına karşın, bugüne kadar tek evcikli (monoik) *Pistacia* genotiplerine de rastlanmıştır (**Özbek ve Ayfer 1958; Crane 1974; Kafkas ve ark. 2000**). *Pistacia* cinsinin ilk sınıflandırılması **Zohary** (**1952**) tarafından yapılmıştır. Onun monografik (bitkinin bütün bilimsel çalışmalarının yer aldığı yayın) çalışmasında *Pistacia* cinsi 4 altbölüme ayrılmıştır. Çeşitli türler içinde ayırdetmede kullanılan başlıca teşhis özellikleri vardır. **Zohary** (**1972**) İsrail'deki *Pistacia* türlerini sınıflandırmış, **Yaltirik** (**1967**) Türkiye'deki *Pistacia* türlerini sınıflandırmış ve onun *P. eurycarpa* olarak isimlendirdiğini Zorhary farklı bir tür olarak *P. atlantica* var. Kurdica Zoh. olarak tanımlamıştır. **Al-Yafi** (**1978**), birkaç *P. atlantica* alttüründe yaprak morfolojilerine dayanarak tanımlama yapmış ve *P. eurycarpa P. atlantica*'nın bir varyetesi olarak kalmıştır. **Kokwaro ve Gillet** (**1980**), Doğu Afrikada birkaç yeni *Pistacia* türü tanımlamış ve *P. aethiopica* Kokwaro olarak isimlendirmiştir. **Lin ve ark.** (**1984**), 9 *Pistacia* türünün yaprak morfolojisi, fotosentez ve yaprak iletkenliklerini karşılaştırmıştır. **El-Oqlah** (**1996**), Jordan da *Pistacia* türlerini morfolojik olarak, anatomik olarak ve polen analizi bakımından tanımlamıştır. **Parfitt ve Badanes** (**1997**), kloroplast DNA profillerine dayanarak *Pistacia* türlerinin sınıflandırmış ve cins olarak iki altbölüme ayırmıştır: *Terebinthus* ve *Lentiscus*. Moleküler verilere dayanarak *P. vera*'da türler arası genetik akrabalık üzerine yapılan birkaç çalışma vardır. İzoenzim ve DNA belirteçleri *P. vera* çeşitlerini ayrımlamada kullanılmıştır (**Louskas ve Pontikis 1979; Hormaza ve ark. 1994, 1998; Dollo ve ark. 1995; Vezvaei 1995; Barone ve ark. 1996; Dollo 1996; Rovira ve ark. 1998; Caruso ve ark. 1998**). Bununla birlikte genomik DNA profilleri kullanılarak yapani *Pistacia* türlerinin türiçi ve türlerarası moleküler varyasyon analizi çalışmaları yapılmıştır. RAPD ve morfolojik veriler kulanılarak Türkiye'deki *Pistacia* germplazmları arasında taksonomik ilişkiler sınıflandırılmıştır (**Kafkas ve Perl-Treves 2001**).

2.1.2. Ekolojik İstekleri

Antepfıstığı farklı toprak tiplerine (fazla tuzlu ve alkali topraklara) adapte olabildikleri gibi sıcak, kurak ve çöl gibi iklim şartlarında da yetiştirilebilirler (**Tous ve Ferguson 1996**). Antepfıstığı daha çok tomurcuk dormansisini kırmaya yetecek kadar soğuklama koşullarına sahip kışların yaşandığı ve meyvelerini olgunlaştırabilecek kadar uzun sıcak yazların olduğu bölgelere adapte olmuştur. Bu tür kuraklığa dayanıklı ve yüksek yaz sıcaklığına toleranslıdır ama yüksek neme toleranslı değildir. Antepfıstığı ağaçları zeytin ve badem gibi soğuğa dirençlidir. Soğuklama gereksinimleri çeşitlere göre 600 - 1500 saat arasında değişmektedir (**Anonim 2017**).

2.1.3. Anaç Özellikleri ve Üretim Durumu

Türkiye'de fazla kullanılan anaç türleri; melengiç (*Pistacia terebinthus* L.), buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks), Atlantik sakızı (*Pistacia atlantica* Desf.) ve *P. eurycarpa* Yalt. gelmektedir. Mevcut *Pistacia* türleri arasında anaç olarak kullanılan türler önem sırasına göre antepfıstığı (*P. vera* L.), buttum (*P. khinjuk* Stocks.), melengiç (*P. terebinthus* L.), Atlantik sakızı (*P. atlantica* Desf.) ve alttürü dikensiz sakız ağacı (*P. mutica*), sakız ağacı (*P. lentiscus* L.), Filistin sakızı (*P. palaestina* Boiss) olarak sıralayabiliriz (**Özbek ve Ayfer 1959; Bilgen 1973; Ayfer ve ark. 1990; Kaşka ve ark. 1995**). Bunlar arasında sakız ağacı ve Filistin sakızı antepfıstığı kültür varyetesine anaç olma kabiliyetleri zayıftır (**Türel ve Ayfer 1959**). ABD'de antepfıstığına anaç olabilecek 3 tür ve 2 melez tür (*P. terebinthus, P. atlantica, P. integerrima*, PG-II, UCB-I) bulunmaktadır. Yapılan testlerde *P. terebinthus* ve *P. atlantica*'nın vertisilyuma çok duyarlı oldukları, *P. integerrima'nın* ise bu hastalığa dayanıklı olduğu saptanmıştır (**Krueger ve Ferguson 1995**). İran'da başlıca *P. mutica, P. khinjuk* ve *P. vera* türleri anaç olarak kullanılmaktadır.

Türkiye'nin 44 ilinde antepfıstığı yetiştiriciliğine rastlanmakta olup bu iller Akdeniz, Ege ve hatta İç Anadolu Bölgesi olmakla beraber ağırlıklı olarak üretim Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılmaktadır. Üretimde en çok söz sahibi olan iller Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Mardin, Kilis, Diyarbakır ve Siirt'tir. Türkiye'de fıstık üretilen bölgeler göz önüne alındığında bölge bazında birçok çeşit yetişebilmektedir. Bunlardan başlıca çeşitler; "Uzun", "Kırmızı", "Siirt", "Ohadi" ve "Halebi"dir. Bu çeşitlerin dışında ülkemizde yetişen diğer antepfıstığı çeşitleri arasında;

"Tekin", "Barak Yıldızı", "Keten Gömleği", "Beyaz Ben", "Değirmi", "Çakmak", "Sultani", "Vahidi", "Mümtaz", "Sefidi" ve "Hacı Şerifi" yer almaktadır (**Anonim 2017c**).

Antepfıstığının dünyadaki ana üreticileri İran, ABD, Türkiye ve Suriye'dir. İran'da 1930'lar itibari ile antepfıstığından ticari olarak üretilmeye başlanmıştır (**Chang 1990**) ve 2016 yılında dünya üretiminin %56.10'unu üretmiştir. İkinci büyük üretici olan ABD ise Kerman çeşidinin kültürünü gerçekleştiriyor. İran ve ABD fıstık üretimini sulu tarım ile gerçekleştiriken Türkiye'de ise sulu tarıma halen geçilememiştir.

Antepfıstığının dünya üretiminde ilk sırayı elinde bulunduran ülke Uluslararası Sert Kabuklu ve Kuru Meyve Konseyi'nin verilerine göre 2016 yılı itibariyle ABD'dir ABD son zamanlarda klonal üretim ve sulama tekniklerinin geliştirilmesini takiben üretim hacmini devamlı arttırmış ve İran'a rakip konuma gelmiştir. Ülkemiz ise dalgalı üretim yapısı ile rekoltenin yüksek olduğu sezonlarda bu ülkelerin ardından üçüncü sırada yer almaktadır (**Anonim 2017b**).

Çizelge 2.1. Dünyadaki antepfıstığı üretimi (ton)

Sıra	Ülke	2015	2016	Değişim	Pay (2016)
1	**ABD**	127.000	317.515	%150	%47.8
2	**Türkiye**	145.000	160.000	%10.3	%24.1
3	**İran**	210.000	150.000	%-28.6	%22.6
4	**Suriye**	25.000	20.000	%-20	%3.0
5	**Afganistan**	5.000	5.000	%0	%0.8
6	**Çin Halk Cumhuriyeti**	4.200	4.200	%0	%0.6
7	**Yunanistan**	4.000	4.000	%0	%0.6
8	**İtalya**	2.500	2.500	%0	%0.4
9	**Avustralya**	1.150	1.150	%0	%0.2
	Genel Toplam	523.850	664.365	%26.8	%100

UIuslararası Sert Kabuklu ve Kuru Meyve Konseyi :INC

Küresel antepfıstığı üretiminde 317.515 ton üretimi ile ABD fıstık üretimi yapılan diğer ülkeler arasında birinci sıraya yerleşmiş ve bir önceki yıla göre %150 oranında bir artışla üretim kapasitesini katlamıştır. Ülkeler çapında antepfıstığı üretimindeki değişmelere bakılacak olursa Türkiye %24.1'lik bir artışla ikinci sıraya yerleşmiştir (Çizelge 2.1.). 664.365 ton olan dünya üretiminin 160.000 tonunu Türkiye yapmaktadır. 2013 - 2014 üretim sezonunda ABD, İran ve Süriye'den sonra dördüncü sıraya yerleşen ülkemiz **(FOA 2014),** 2016 yılı verilerinde ikinci sıraya yükselmiştir.

Antepfıstığının dış ticaretteki ihracat miktarı ne yazık ki üretimde gösterilen başarıya paralel olmamaktadır. Dünya ihracatında ABD ve İran kaynaklı fıstıkların düşük fiyatlı olması, meyvelerin iri taneli olması ve çıtaklık oranının yüksek olması bakımından çok fazla rağbet görmektedir. Ülkemizdeki fıstıkların daha küçük taneli olması ve yüksek fiyatlı olması dünya pazarında rekabet alanında zorluk yaratsa bile tadının yoğun olması bu rekabette avantaj sağlamaktadır.

Çizelge 2.2. Antepfıstığının dünyadaki ihracat durumu (1000 $)

Sıra	Ülke	2014	2015	Pay (%)
1	**İran**	993.148	772.660	%33.0
2	**ABD**	993.108	775.749	%32.3
3	**Hong Kong, Çin**	361.145	264.862	%11.3
4	**Almanya**	161.736	159.076	%6.8
5	**Hollanda**	98.659	95.186	%4.1
6	**Belçika**	45.381	74.272	%3.2
7	**Türkiye**	19.925	51.341	%2.2
8	**Afganistan**	42.007	28.777	%1.2
9	**Lüksemburg**	11.508	23.705	%1.0
10	**Yunanistan**	15.571	17.948	%0.8
	Genel toplam	2.903.662	2.339.540	%100

International Trade Center (Trademap)

2015 yılı International Trade Center verilerine bakıldığında dünyadaki antepfıstığı ihracatının yaklaşık 2.3 milyar ABD dolarına ulaştığı görülmektedir. Bu ihracattaki en büyük payın sahibi 773 milyon dolar ile İran, ikinci sıranın sahibi ise 756 milyon dolar ile ABD olmuştur (Çizelge 2.2.). Ülkemiz dünya fıstık ihracat yarışında 7.'nci sırada yer almakta fakat üretim ve ekili alan miktarları ile kıyaslandığında ihraç miktarının potansiyel olarak çok gerisinde kalmaktadır.

2.1.3.1. ***Antepfıstığı (P. vera* L.)**: Türkiye, İran ve diğer Ortadoğu ülkelerinde yeni bahçelerin kurulmasında genellikle antepfıstığı kültür varyetelerinin tohumları kullanılmaktadır. Bu türün anaçları diğer *Pistacia* türlerine oranla daha fazla yan kök oluşturmakta ve daha erken dönemde aşılama kalınlığına ulaşmaktadır. Bol miktarda oluşan yan kökler dikim sırasında çöğürlerin tutma oranını arttırır. Antepfıstığı anaçlarının büyümelerinde farklılıklara rastlanmakta bu nedenle anaç ile kültür çeşitleri arasında uyuşmazlıklar ortaya çıkmakta ve ara aşı yapma zorunluluğu doğmaktadır (**Ayfer ve ark. 1990**). Ancak üzerine aşılanan çeşidin taç hacmi ve verimi, ilk yıllarda

diğer anaçlara göre daha düşük olmaktadır. Bu nedenle anaç olarak en çok "Uzun" ve "Kırmızı" çeşitlerinden elde edilen anaçlar kullanılmaktadır (**Özçağıran ve ark. 2005**). Diğer türlerle kıyaslandığında "Siirt" çeşidinin aşı kalınlığına göre daha daha çabuk eriştiği rapor edilmiştir (**Tekin ve ark. 2001**).

Joley (**1960**), yaptığı çalışmada antepfıstığı tohumundan yetiştirdiği bitkilerin toprak nematodlarına karşı daha dirençli oldukları rapor edilmiştir. *P. vera*, sebep olduğu vertisilyum (*Verticillium dahliae*'nın sebep olduğu) solgunluğuna hassasiyet göstermesi sebebiyle kullanılabilir anaç özeliği taşımamakta ve anaç olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Fidanlar ilk çıkışta özellikle erken dönemlerde kontrollü seralardaki tüplü yetiştiricilikte iri yaprakları nedeniyle bitkiler yatmaya meyilli olmaktadır. Bunu engellemek için tohum dikiminden 2 ay sonra destek (herek) dikilerek fidanların dik gelişmeleri sağlanmalıdır (**Arpacı ve ark. 1999**).

Garcia (**1980**), *P. vera*'nın nematoda dayanıklı fakat vertisilyum (*Verticillium dahliae* Kleb) solgunluğuna, kök ve gövde çürüklüğüne duyarlı olduğunu bildirmiştir.

2.1.3.2. *Buttum (P. khinjuk* Stocks): Diğer türlerin yetişemediği ve ticari olarak üretiminin yapılamadığı kötü koşullu arazi şartlarında yetişebiliyor olması buttumun önemini arttırmaktadır. Ayrıca bu türü önemli kılan antepfıstığının doğal bir anacı olması, kültür çeşitleriyle uyum sağlaması ve aşılama sonrası çeşidin gelişimi bakımından iyi sonuçlar vermesidir.

Antepfıstığı anaçları arasında toprakta bulunan azottan en yüksek oranda faydalanan türün buttum olduğu kaydedilmiştir (**Bilgen 1968**). Buttum çöğürü antepfıstığı ve Atlantik sakızı çöğürlerinden daha kısa boylu olmasına rağmen, aşı yapıldıkdan sonra anaç ve kalem arasında gelişmenin uygun olması nedeniyle iki türden daha düzgün gövdeler oluşturmaktadır (**Tekin ve ark. 2001**).

Buttum anacının fidan üretiminde kullanılması, anacın sınırlı büyümesi ve aşı noktasının diğer türlere göre daha kalın olması nedeniyle aşılama sırasında büyük avantaj sağlamaktadır. Buttum anaçlarının düzgün gövde oluşturmasının yanında kültür çeşitleri ile aşı uyuşma oranı yüksektir. Aşı noktasında herhangi bir deformasyon ya da gelişmede farklılık olmaz (**Özbek 1978; Tekin ve ark. 2001**). Bu türün anaçları kültür çeşitleri ile daha uyumlu bir gelişme göstermekte ve aşıda uyuşmazlık yaşanmamaktadır (**Kuru ve ark. 1986; Bilgen 1973**). Buttum anacına aşılanmış antepfıstıklarında aşı

yerlerinde kayde değer bir şişkinlik ve deformasyon görülmemekle birlikte önemsiz bir şişkinlik meydana gelebilmektedir (**Bilgen 1985**). Buttum anaçlarının fidanlıkta tüplü olarak aşıya gelme yaşı 1.5–2 yıl, anaçla bahçe tesisinde ise 3-4 yıldır. Kültür çeşitleriyle iyi derecede uyuşma gösterir. Yapılan bazı çalışmalardan elde edilen ortalama verim değerleri incelendiğinde, Atlantik sakızı ve buttum üzerine aşılı ağaçlardan diğer türlere göre daha yüksek verim alınmıştır (**Arpacı ve ark. 2013**).

2.1.3.3. ***Atlantik Sakızı (P. atlantica* Desf.)**: Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü bölgelerde yoğun olarak bulunmaktadır. Taç yüksekliği 15-20 m olan ağaçları ile ülkemizde bilinen en büyük taçlı antepfıstığı ağaçlarını oluşturur. Bu bağlamda park ve bahçelerde peyzaj ağacı olarak kullanılmaktadır. Aşı uyuşması iyidir. Tüplü fidan üretiminde diğer anaçlarla aynı zamanda aşı kalınlığına ulaşmasına rağmen, daha fazla yan dal oluşturması aşılama sırasında sorun çıkarmaktadır. Tohumları sakız ağacı tohumlarına benzer, %60 oranında yağ içermekte olup, fındık gibi yemeklik yağ üretiminde kullanılabilir. Reçine, alkol ve lake üretimi için kullanılır. Parfüm sektöründe kullanılan uçucu yağlar içerir. Kurutulmuş bitki kısımları tütsü olarak kullanılır ve yandığında hoş bir koku verir.

Arpacı ve ark. (**2013**) bir araştırma projesinin ara sonuç raporunda yapılan değerlendirmede, gelişme yönünden Atlantik sakızı, ilk meyve gözü oluşturma ve verim değerleri yönünden melengiç üzerine aşılı ağaçlar, diğerlerinden daha iyi sonuç vermiştir. En iyi gövde gelişimi Atlantik sakızından, en zayıf gelişme ise melengiçten elde edilmiştir. Taç hacmi yönünden buttum ve Atlantik sakızı diğer türlerden daha iyi gelişme göstermişlerdir. Atlantik sakızı, antepfıstığı ve çöğürleri aşı yerlerinde gövde çaplapları fazla gelişmemekle birlikde boyları daha uzundur (**Tekin ve ark. 2001**). Antepfıstığı Araştırma İstasyonu tarafından yapılan bir araştırmada, tohum yastıklarında antepfıstığının gelişmesi, Atlantik sakızı ve buttuma nazaran daha fazla olmuş, fakat aşılamadan sonra en hızlı gelişme Atlantik sakızı anacında saptanmıştır. Ayrıca bu anaçlar üzerine 5 farklı çeşit aşılanmış, bunların en fazla Atlantik sakızı anacı üzerinde geliştikleri bildirilmiştir (**Bilgen 1985**).

2.1.3.4. ***Melengiç (P. terebinthus* L.)**: Akdeniz ülkeleri ve Batı Asya'da yaygın olarak görülen bir bitkidir. Bu tür *Anacardiaceae* familyasına ait olup, Türkiye'de genellikle batı ve güney bölgelerde görülür. Ağaçlarının aşılanması suretiyle antepfıstığı

bahçeleri oluşturulmaktadır. Ülkemizde hem nemin ve yağışın çokça olduğu Akdeniz ikliminde, hem de yağışın az olduğu kurak iklimlerde yetişebilen, yüksek uyum kabiliyeti olan bir türdür. Yabani olarak ormanlık alanlarda ve dağlarda ocak halinde 2-6 m boylanan ağaçlar oluşturur. Işık istekleri fazladır. *Pistacia* türleri içerisinde en kuvvetli kök sistemine sahiptir. Zayıf veya bodur özelliğinden dolayı, üzerine aşılı çeşitler erken meyveye yatmakta ve üretilen meyve bol ve kaliteli olmaktadır (**Tekin ve ark. 2001**). Fidanlıkta anaç gelişimi yavaş olduğu için fidan üretiminde kullanılamamakta ve fidancılar tarafından tercih edilmemektedir. Ancak yabani melengiç anaçlarının kök nematodlarına karşı dayanıklı olduğu belirtilmektedir (**Yardımcı 1973**). Meyveleri çerez ve kahve yapımında kullanılmaktadır.

Dünyanın farklı bölgelerinde melengiç ağacının bütün kısımlarından çok yönlü yararlanılmaktadır. Türkiye'de yapılan arkeolojik çalışmalar melengicin eski dönemlerden bu yana besin maddesi olarak kullanıldığını kanıtlamıştır. Meyvelerin iştah açıcı özelliği olduğu bilinmekte ve bu durum özel ekmeklerde kullanılmakla birlikte, kahve ve çay olarak da tüketilmektedir.

Bilgen (**1968**), ülkemizde yaygın olarak bulunan antepfıstığı anaçları içerisinde sayı bakımından melengicin en fazla olduğunu, bunu sırasıyla antepfıstığı, buttum ve Atlantik sakızının izlediğini, bu anaçların ülkemizin değişik bölgelerinde; sakız, buttum, melengiç, çıtlak, çitlenbik, çedene, gizvan ve teftere gibi isimlerle anıldığını bildirmektedir. Melengiç anacı üzerine aşılı antepfıstığı çeşitlerinde anaçla kalemin birleştiği yerde bir şişkinlik oluştuğunu, bunda zayıf bir anaç üzerine kuvvetli gelişen bir çeşidin aşılanması nedeniyle uyuşmayan iki dokunun karşı karşıya gelmesinin neden olduğunu belirtmektedir. Bodur bir anaç durumunda olan melengiç üzerine antepfıstığı aşılandığında, kalem tarafından anormal bir şişkinlik oluşmakta, bu şişkinlik erken meyveye yatırmaktadır. Ancak bu durum ağaçta peryodisitenin (bir yıl az, ertesi yıl daha fazla ürün) meydana gelmesine neden olmaktadır (**Bilgen 1973**). Melengiç kök ve gövde çürüklüğüne dayanıklı olduğu için Yunanistan'da antepfıstığına göre daha çok tercih edildiği bildirilmektedir (**Özbek ve Ayfer 1959; Ayfer 1964; Pontikis 1984**). Öte yandan Yunanistan'da kireçli topraklarda melengiç üzerine aşılı antepfıstığı daha iyi büyüme göstermektedir (**Woodroof 1982**). İlk meyve gözü oluşturma ve erken meyve vermeye başlamada melengiç üzerine aşılı ağaçlar diğerlerinden daha iyi sonuç vermiştir. Yapılan çalışmada aşılamadan iki yıl sonra verim alınmaya başlandığı, verim

yönünden ilk 6 yıl yapılan değerlendirmelerde dikim aralıklarına bağlı olmadan melengiç üzerine aşılı ağaçlar diğer türler üzerine aşılanan ağaçlara göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (**Arpacı ve ark. 2013**).

2.2. Antepfıstığı Islahı İle İlgili Çalışmalar

Türkiye'de yetiştirilen *Pistacia* türleri içerisinde sadece antepfıstığının kültürü ve ticareti yapılmaktadır. Bu tür içerisinde de çeşit sayısı çok fazla değildir ve bugüne kadar elde edilen çeşitler yapılan seleksiyon ıslahı çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Melezleme yoluyla antepfıstığı çeşit ıslahı çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu konuda ABD, Türkiye ile İspanya'da çalışmalar devam etmektedir (**Kafkas 2006**). Antepfıstığının dioik çiçek yapısına sahip olması ve gençlik kısırlığı döneminin uzun olması nedeniyle ıslah çalışmaları oldukça uzun zaman almaktadır. Ülkemizde melezleme yoluyla çeşit ıslahı çalışmaları 1995 yılında Antepfıstığı Araştırma Enstitüsünde ve 2001 yılında ise Çukurova Üniversitesinde başlamış ve halen devam etmektedir (**Kafkas ve ark. 2003; Uzun ve ark. 2005**).

Ülkemizde antepfıstığının diğer meyve türlerinin yetişemeyeceği olumsuz toprak koşullarında yetiştirileceği kanısının yaygın olması nedeniyle, yetiştiricilik tamamen kuru koşullarda, taşlık ve meyilli arazi şartlarında yapılmaktadır. Diğer yandan antepfıstığı üretici ülkeler arasında yalnızca, İran ve ABD'deki yetiştiriciliğin çoğunluğu sulu tarım ile verimli arazilerde yapılmakta ve buna bağlı olarak verim daha fazla olmaktadır (**Tekin ve ark. 2001; Özden-Tokatlı 2005**). Ülkemizde ise antepfıstığı yetiştiriciliğinin sadece %37.5'i sulu koşullarda, geri kalan %62.5'i ise tamamen kuru şartlar altında yapılmaktadır (**Polat ve ark. 2006**). Bu durum da verimsiz arazi koşullarında yetiştirilen antepfıstığı ağaçlarında yüksek oranda gençlik kısırlığı (juvenilite) oluşmasına neden olmaktadır (**Tilkat 2006**). Dolayısı ile diğer meyve türlerine göre oldukça uzun gençlik kısırlık süresi olan antepfıstığı ağaçları, genellikle 5. veya 6. yıldan itibaren ürün vermeye başlamakta, ekonomik verim miktarına ise ancak 10. yıldan sonra ulaşmaktadır. Dioik bir bitki olan antepfıstığı üretiminde verim ve kalitenin arttırılması ile üretimin istenilen seviyede gerçekleştirilmesinde en önemli etkenlerden birisi de dişi ağaçlar ile uygun çiçeklenme zamanına sahip özellikle üstün nitelikli erkek çeşitlerin çoğaltılmaları ve ticari bahçelere dişi ağaçlarla birlikte dikilmesi gerekliliğidir (**Tilkat 2006**). Bununla birlikte, antepfıstığının ülkemizdeki en

yaygın çoğaltım yöntemi aşılamadır. Bu işlem yılın yalnızca belli bir döneminde ve çok kısa bir süre için uygulanabildiğinden ve aşı tutma oranlarının düşük olması başta olmak üzere bazı sorunlar nedeniyle (**Kaşka ve ark. 1990**) vejetatif çoğaltım yöntemleri artan talebi karşılayacak bir düzeye gelememektedir. Bu nedenle, antepfıstığında yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemler hala birçok sorunla karşı karşıyadır (**Onay 2012**). Günümüzde ticari antepfıstığı plantasyonunun genişlememesinin en önemli sınırlayıcı etkeni vegetatif çoğaltım yöntemlerinden birkaçının kullanılmasıyla çoğaltılabilen üstün karakterli fidelerin kısa sürede çoğaltılamaması ve çoğaltmada karşılaşılan sorunlar nedeniyle geleneksel yöntemlerin kullanılmasıdır. Bu nedenle sahip olduğumuz antepfıstığı potansiyelimiz ve ekonomimizdeki önemi nedeniyle ülkemizde antepfıstığı üretiminin sürdürülebilirliği bakımından, antepfıstığı tarımının ihtiyaç duyduğu yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve korunması için mevcut çoğaltım tekniklerinin bitki hücre, doku ve organ kültürü teknikleri gibi geleneksel yöntemlere tamamlayıcı olabilecek güncel biyoteknolojik yöntemler ile desteklenmesi ve uygun ıslah programlarının yürütülmesi gerekmektedir. Özellikle dünyanın en büyük sulama projelerinden birisi olan GAP, Amerika'da olduğu gibi sulanabilir alanda antepfıstığı yetiştiriciliği için bir fırsat sunduğu gibi, bazı problemlerin de ortaya çıkmasına neden olabilecektir. Çünkü antepfıstığı ağaçları türe özel iklim isteklerinden dolayı bu sulanabilir alanlar için yeni kültür çeşitlerine gereksinim duyulabilir. GAP ile oluşan hem sulanabilir hem de kurak koşullarda antepfıstığı üretimine uygun melez anaçların seleksiyonu ve bu anaçların önemli çeşitlerimiz üzerindeki verim ve kalite değerlerine olan etkilerinin araştırılması oldukça önem arz etmektedir (**Ayfer ve ark. 1990**). Bu bağlamda dış ticaretimizde önemli bir yeri olan antepfıstığının, ulusal gelirimize olan katkısını arttırmak için, üstün özellikteki çeşitlerle uyumlu, hızlı gelişen, klonal anaçların kullanıldığı antepfıstığı bahçelerinin tesisi gereklidir. Ancak, antepfıstığı dioik bir bitki olduğu için tohumdan gelişen her genetik olarak değişkenlik göstermekte ve %50 erkek, %50 dişi ağaç olma ihtimaline sahiptir (**Onay 1996**). Bu nedenle yabancı tozlaşma ile üretilen tohumların yerine kontrollü tozlaştırma ile üretilmiş melez tohumlardan gelişen hastalıklara dayanıklı fidanların üstün nitelikli standart kültür çeşitleri ile aşılanması gerekmektedir. Melez tohumlardan itibaren başlatılacak *in vitro* aksenik kültürlerden, sınırlı alanlarda yılın bütün döneminde istenildiği kadar fidan üretilebilir. Bu bağlamda Gaziantep

Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü kapsamında daha önceki ve halen devam etmekte olan çalışmalar sonucunda üstün özellikleri belirlenen melezlerin iyileştirilmesi zorunludur. Bugün, aşılı antepfıstığı fidanlarının üretiminde kullanılan 9 anaç türü vardır. Bunlar; Atlantik sakızı (*P. atlantica*), Çin sakızı ağacı (*P. chinensis*), *P. integerrima*, buttum (*P. khinjuk*), sakız ağacı (*P. lentiscus*), dikensiz sakız ağacı (*P. mutica*), *Filistin sakızı (P. palaestina),* melengiç (*P. terebinthus*) ve antepfıstığı (*P. vera*)'dır (**Barghchi ve Alderson 1989**). Atlantik sakızı, *P. integerrima* ve melengiç Kaliforniya'da kullanılan başlıca anaçlardır. Bu anaçlar fungus ve nematodlara karşı daha dirençlidirler (**Michailides ve ark. 1988**). Dikensiz sakız ağacı ve buttum İran'da çok yaygın olarak kullanılan iki anaçtır. Türkiye'de ise ya doğal olarak yetişen yabani antepfıstığı ağaçları ya da kültür çeşitlerinin tohumları anaç üretiminde kullanılmaktadır. Antepfıstığının tercih edilmesinin nedeni fidanlarının diğer türlerden daha fazla yan kök ve kalın gövdeye sahip olması ve kısa dönemde aşılama kalınlığına gelmesidir (**Ayfer ve ark. 1990**). Atlantik sakızı ve buttum fidanları boyuna hızlı gelişme göstermekte ancak diğer türlerden daha ince ve cılız fidanlar oluşturmakta ve göz aşısı uygulanması için yeterli kalınlığa daha geç ulaşmaktadır. Atlantik sakızı ve melengiç anaçları ise, ABD'de ticari üretimde yaygın oranda kullanılmaktadır (**Joley ve Opitz 1971; Woodroof 1979; Hartmann ve Kester 1983**). Fidanlıklarda karakteristik olarak yavaş büyümelerine karşın, antepfıstığı çeşitlerinin ara anaç kullanımı yoluyla iki anaç üzerine aşılanması ile daha hızlı büyüme ve daha fazla ürün elde edilebilmektedir (**Joley 1969**). Atlantik sakızı ve melengiç anaçlarının, vertisilyuma son derece hassas olduğu bildirilmiştir (**Hartmann ve Kester 1983**). Çok yavaş büyüme alışkanlığından dolayı *P. terebinthus* bodur ağaçları erken ürün vererek, bol miktarda ve yüksek kalitede meyve vermektedir. Genellikle melengice aşılanmış antepfıstığı fidanlarının sulu tarım için uygun olabileceği kabul edilmektedir.

Joley (**1973**), ABD'de *Pistacia* cinsinin çeşitli türlerinin anaç olarak kullanıldığını, ancak fidan elde etmek için Atlantik sakızı ve melengiç anaçlarının tavsiye edildiği, bu türlerden yetiştirilen çöğürlerin antepfıstığından yetiştirilenlere oranla başlangıçta yavaş büyüdükleri bildirilmektedir. Ancak kısa bir zaman diliminde gelişerek antepfıstığı çöğürlerini geçtiklerini vurgulamakta ve antepfıstığı köklerinin nematodlara ve kök kanserine karşı çok hassas olmasına karşın, Atlantik sakızı ve

melengiç çöğürlerinin bu hastalık ve zararlılara bir dereceye kadar daha dirençli olduklarını bildirilmektedir.

Özçağıran (1974), aynı meyve çeşidinin, farklı anaçlar üzerindeki gelişme durumu, ürüne yatma süresi, ürün miktarı ve kalitesi, ağacın ömrü ve ekolojik koşullara adapte olması bakımlarından önemli farklar gösterdiğini ve ağacın gelişme kuvveti, ömrü, verime yatma süresi, verimliliği, meyve kalitesi, bazı ekolojik koşullara, hastalık ve zararlılara karşı dayanımı üzerinde anacın etkili olduğu vurgulanmaktadır.

Ulusaraç (1992), kuru koşullarda, Atlantik sakızı ve buttum üzerine aşılı çeşitlerin antepfıstığı üzerine aşılı çeşitlere göre daha büyük taç oluşturduklarını ve bunlarda gövde gelişiminin daha iyi olduğunu saptamıştır.

Kafkas ve Kaşka (1997), melez tohumların çimlenme oranlarının ve çimlenme yüzdelerinin araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek çimlenme oranının buttum dişilerinin kullanıldığı kombinasyonlardan elde ettiklerini, erkek tozlayıcı olarak Atlantik sakızı, dişi olarak buttum kullanıldığında ise, gelişimi zayıf olan çöğürlerin elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kafkas ve Kaşka (1998), ülkemizde de çabuk yetiştirilebilen, hastalıklara dayanıklı anaç bulmak amacıyla türler arası ve tür içi melezlemelerin 1996 yılında yapılmaya başlandığını, melezlemede *P. terebinthus* × *P. terebinthus*, *P. terebinthus* × *P. atlantica*, *P. atlantica* × *P. atlantica*, *P. atlantica* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* Stocks × *P. khinjuk* Stocks, *P. khinjuk* Stocks × *P. atlantica*, *P. khinjuk* Stocks × *P. terebinthus* başta olmak üzere 15 kombinasyon kullanıldığını, melez tohumların çimlenme oranlarının ve çimlenme yüzdelerinin incelenmesiyle en iyi çimlenme oranının *P. khinjuk* Stocks dişilerinin kullanıldığı kombinasyonlardan, en az çimlenme oranının ise *P. terebinthus* dişilerinin kullanıldığı kombinasyonlardan elde edildiğini; tohumlardaki tozlayıcılar da erkek olarak *P. atlantica,* dişi olarak *P. khinjuk* Stocks kullanıldığında gelişimi zayıf çöğürler elde edildiğini bildirmişlerdir.

Atlı ve ark. (2002), ebeveyn olarak saptanan 4 buttum tipi ile 5 antepfıstığı, 5 buttum, 5 Atlantik sakızı ve 5 melengiç erkeği arasında türler içi ve türler arası melezlemeler yapmış ve en iyi gelişmeyi üç farklı dişi buttum genotipi ve bir erkek Atlantik sakızı erkek genotipinden elde edilen 3 melez kombinasyonunu ümit veren melez anaç adayları olarak saptamışlardır.

Ferguson ve ark. (**1994**), Kaliforniya'da yürüttükleri bir anaç denemesinde, iki tür *P. atlantica* ve *P. integerrima* (PG) ile iki melez PG-II (*P. integerrima* × *P. atlantica*), UCB-I'i (*P. atlantica* × *P. integerrima*) kullanmışlardır. UCB-I ve PG-II anaçları üzerindeki çeşitlerin birbirlerine eşit ve diğer anaçlara göre daha iyi geliştikleri gözlenmiştir. UCB-I denemede kullanılan diğer anaçlara göre daha önce meyveye yatmış (4 yıl sonra) ve bu kombinasyondan aşıdan 5 yıl sonra değerlendirilebilecek kadar meyve alınmıştır. En fazla ve kaliteli ürün UCB-I üzerindeki çeşitlerden alınmış bunu sırasıyla PG-I, PG-II ve *P. atlantica* izlemiştir.

Krueger ve Ferguson (**1995**), ABD'de halen yeni kurulan bahçelerde üstün özellikleri olan PG-II ve UCB-I anaçlarının kullanıldığını ve bu anaçların soğuğa ve vertisilyum solgunluğuna dayanıklı olduğunu ve gelişme kuvveti ve erken meyveye yatma özelliklerine sahip anaçlar olduklarını bildirmişlerdir.

Arpacı ve ark. (**1999**), tarafından ülkemizde yapılmış olan kapsamlı 3. ıslah çalışması ile değişik *Pistacia* türlerinden olan *P. vera, P. khinjuk, P. atlantica* ve *P. terebinthus* anaçları üzerinde ağaç gelişimi ve meyve tutmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Saksıda yetiştirilen bu anaçlar 1994 Şubat ayında Harran Ovasına 2x7 m, 4x7 m ve 6x7 m aralıklarla dikilmiştir. Sezon sonunda anaçların büyümelerini belirlemek için ölçümler yapılmıştır. Anaçlar üzerine 'Siirt' varyetesi ve uygun erkekleri aşılanmıştır. Meyveler oluştukdan sonra sayımları yapılmıştır. En iyi gövde çapı gelişimi (35.23 mm) *P. atlantica* ağacında elde edilirken, en az gelişen ise *P. terebinthus* (33.25 mm) olmuştur. Diğer türler bu iki grup arasında kalmıştır. Gövde gelişimi bakımından en iyi sonucu veren çeşit ise *P. terebinthus* üzerine aşılanmış ağaçlardan elde edilirken, en az gelişen gövde ise *P. vera*'dan elde edilmiştir. En fazla tomurcuk sayısı aşılı *P. terebinthus* anacında (16.7) sayılmıştır. Diğer tarafdan en az tomurcuk veren ise *P. vera* ve *P. atlantica* olmuştur. Meyve tomurcuğu akımından en iyi sonucu 31 ağaçdan 19'unda gelişerek aşılı *P. terebinthus* ağacından elde edilmiştir. En kötü sonuç ise *P. khinjuk* üzerine aşılı ağaçlardan elde edilmiştir. Sonuç olarak gövde gelişimi bakımından en iyi sonucu *P. atlantica* vermiş, meyve vermeye başlama yaşı olarak ise en iyi sonucu *P. terebinthus* vermiştir.

Atlı ve ark. (**2002**), tarafından yapılan diğer bir çalışmaya göre ise, dişi *P. khinjuk* Stocks (buttum) genotipi ve erkek *P. atlantica* genotipinden elde edilen melez kombinasyonların umut verici melez anaç adayları olarak gösterilmiştir.

Günümüzde antepfıstığına anaç olarak geleneksel yöntem ile yani tohumdan elde edilen çöğürler kullanılmaktadır. **Ayfer ve Serr** (**1961**), tarafından yapılan çalışmada, *Pistacia* türlerinin geleneksel yöntem ile anaç elde edilmesi ile çimlenme oranının beklenenden çok düşük düzeyde olması üreticiler için önemli bir sorun oluşturduğunu vurgulamışlardır. Antepfıstığı anaç üretiminde karşılaşılan sorunlardan biri tohumların çimlenme ve köklenme sorunları oluşturmaktadır **(Rahemi ve Baninasab 2000**). Aynı zamanda bilinen eski yöntemlerle anaç eldesinde tohumdan elde edilen bitkinin istenilen özelliklerde olduğunu anlamak için çok uzun yılların geçmesi gerekmektedir. Üretici generatif çoğaltım ile anaç eldesinde karşılaştığı zorluklar ve anaçın istenilmeyen özellikleri taşıması gibi olumsuzluklarla karşılaşmasından dolayı vejetatif çoğaltımın avantajlarını kullanmak durumundadır (**Graham ve ark. 2003**).

Antepfıstığı anaçlarına ait tohumların çimlenme oranlarının düşük olması nedeniyle tohum temin edilmesi çok zor olmaktadır. Yapılan araştırmalarda tohumların kabuklarının soyulması ve suda bekletilmesi ya da çimlenmeyi artıran gibberellinler gibi bazı kimyasal maddelerin kullanılması gibi mekanik ve kimyasal uygulamalar yoluyla ekimden önce yapılan işlemler çimlenmeyi büyük ölçüde arttıran faktörler olarak tespit edilmiştir (**Ayfer ve Serr 1961**).

Kuru ve ark. (**1986**), tohum ekimden önce 13–14 sıcaklıkta yaklaşık 15 gün fıstık tohumların suda bekletilmesinin çimlenme oranında arttış olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, çimlenme oranı ekimden önce tohum kabuğunun çıtlatılması ile de artırılabilinir.

Yukarıda özellikle ülkemizde yapılan anaç ıslah çalışmaları özetlendiğinde, henüz bütün araştırma sonuçlarının işaret ettiği ülkemize özgü üstün özellikleri belli olan ve yoğun üretimde kullanılabilecek ortak bir melez anaç kombinasyonu tespit edilememiştir. Ülkemizde farklı ekolojik koşulların bulunduğu bölgelerde antepfıstığı yetiştiriciliğinin geliştirilmesi ve İran ve Amerika ile rekabet için tescilli klonal anaç eldesi ve kullanımı ile yeni verimli bahçe tesislerinin oluşturulması gereklidir. Bu

nedenle, antepfıstığına anaç olarak kullanılabilecek melez genotiplerin üretilmesinde klasik yöntemlere yardımcı biyoteknolojik yöntemlerin geliştirileceği bu tez çalışması ile melez genotiplerin hızlı klonal çoğaltımına olanak verecek, yetiştirme süresini kısaltacaktır.

2.3. Anaç Olarak Kullanılan *Pistacia* Türlerinin Mikroçoğaltımı ve Klonal Anaç Kullanımının Önemi

Ülkemizde eski çağlardan bu yana antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmasına rağmen, üretim istenilen düzeyde artmamış ve yoğun üretime geçilememiştir. Bunun nedenleri; antepfıstığının diğer meyve türlerinin yetişemeyeceği kötü toprak koşullarında yetiştirileceği kanısının yaygın olması nedeni ile yetiştiriciliğin tamamen kuru kıraç, taşlık ve meyilli arazilerde yapılmasıdır. Ayrıca, kötü koşullarda yetiştirilen antepfıstıklarının gençlik kısırlık dönemlerinin uzun olması, yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerimizin mutlak periyodisiteye daha yatkın olması ve iyi bir tozlanma ve döllenme için üstün nitelikli erkeklerin bulunmayışıdır. Bu sorunlar yüzünden üreticiler birinci sınıf arazilerde antepfıstığı yetiştirmeye yönelmemektedir. Ülke olarak sahip olduğumuz antepfıstığı potansiyelimiz ve ekonomimizdeki önemi nedeniyle bu meyve çeşidinde; kaliteli-seçkin anaçların ve tam teşekküllü ıslah programlarının olmaması, bitkinin dioik yapıda olması, çeliklerinin köklenmemesi, aşılama ile çoğaltımda yaşanan bir takım sorunlar, bazı durumlarda ara aşı gerektirmesi, uzun gençlik safhasının olması gibi fizyolojik bazı sorunlar ile mikrobiyal bazı hastalıklar antepfıstığı tarımını sınırlandırmaktadır. Tüm bu nedenler, türün üretim alanı ve ürün miktarının artırılması için biyoteknolojik metotların çalışılmasını zorunlu kılmaktadır.

Yaygın olarak anaç eldesinde geleneksel bir şekilde süre gelmiş olan bir yöntemle yani tohumun çimlendirilerek anaç elde edilmesi yöntemi kullanılmaktadır. Neyazık ki bu yöntemle elde edilen fidanlar generatif çoğaltımdan dolayı genotip olarak farklı anaç oluşumuna yol açmaktadır. Bu yöntem ile anaç eldesi ayrıca çok geniş arazilere ve yüksek iş gücüne gerek duymaktadır. Çok daha küçük bir alan ve kısa zaman içinde homojen popülasyonlu bitkileri elde etmenin en uygun yöntemi doku kültürü teknikleri kullanılarak mikroçoğaltım yapılmasıdır (**Karishna-Pillay 2000**).

Bitki hücre, doku ve organ kültürü teknikleri (organogenez, embriyogenez, mikroaşılama), geleneksel yöntemlerle çoğaltıma alternatif yaklaşımlar getirmektedir.

İstenilen nitelikte ürün veren antepfıstığı ağaçlarının standart çeşitlerinden alınan eksplantların klonlanarak, *in vitro* çoğaltım protokolleri geliştirilmesine yönelik araştırmalar yaklaşık 31 yıl önce başlamıştır (**Barghchi 1982**). Antepfıstığı ağaçlarının geleneksel yöntemler ile yüzyıllarca yetiştirilmiş olmasına karşın; bu türlerin *in vitro* mikroçoğaltımına ancak 1982'den itibaren özel bir önem verilmiştir. Antepfıstığı türlerinin mikroçoğaltımı üzerine yayımlanmış araştırmaların çoğunda juvenil materyal ve az miktarda olgun yaşlı bitkisel materyal kullanılmıştır. *Pistacia* cinsinin farklı türlerinin anaç bitkileri ve tohumları üzerinde çok sayıda araştırıcı tarafından bitki doku kültürü yöntemleri kullanılmış ve başarılı araştırma sonuçlarının elde edildiği bildirilmiştir (**Barghchi ve Alderson 1985; Onay ve ark. 1995; Onay 2000a, 2000b; Tilkat 2003; Özden-Tokatli ve ark. 2005; Tilkat 200; Yıldırım 2012; Çalar 2013**). Bununla beraber, antepfıstığı anaçlarının ticari mikroçoğaltımı için laboratuvardan bahçeye bütünleşmiş bir çoğaltım yöntemi rapor edilmemiştir. Bu nedenle bu tezin ana konusu klasik melezleme ile elde edilecek melez genotiplerin hızlı çoğaltımı için, tüm mikroçoğaltım basamakları belirlenerek, rutin olarak kullanılabilecek bütünleşmiş çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesidir. Antepfıstığının biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltılmasında kullanılabilecek *in vitro* kültür koşullarının ayrıntıları ile bu konuda yapılan yayınlar günümüze kadar birçok çalışmada derlenmiştir (**Hansman ve Owens 1986; Barghchi ve Alderson 1989; Onay ve Jeffree 2000; Onay 2003; Onay ve ark. 2003; Onay 2005; Onay ve ark. 2007; Hormaza ve Wünsch 2007; Hormaza ve Wünsch 2011; Özden-Tokatlı ve ark. 2010; Tilkat ve ark. 2012; Çalar 2014**).

Klonal çoğaltım odunsu bitki türlerinde homojeniteyi ve üretkenliği artırmak için etkili bir tekniktir. Son on yıldır, bitki mikropropagasyonu bahçe bitkileri endüstrisine çok önemli katkısı olmuştur. Birçok bitkinin başarılı mikropropagasyonu ticarileşme için kullanılmaktadır. Dünya çapında birçok ticari laboratuvar *in vitro* teknolojileri kullanmaktadır. Odunsu türlerin *in vitro* çoğaltımı; genetik manipülasyon, hastalıksız bitkinin hızlı üretimi, mevsime bağlı olmadan bitki üretebilmek, seçkin genotipik özelliklerin daha hızlı çoğaltılması ve germplazma korunumu gibi geleneksel vejetatif çoğaltım proplemlerinin üstesinden gelebilecek birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlara rağmen bitki doku kültürü tekniklerinin çoğaltım teknikleri pahalıdır (**Benmahioul 2017**).

Bitki germplazmalarının korunması için organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla mikroçoğaltım (**Edson ve ark. 1994**) ve mikroaşılama gibi *in vitro* bitki hücre ve doku kültürü yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir (**Feijoo ve Iglesias 1998; Onay ve ark. 2003a; Yıldırım 2013**). Bu sebeple, organogenez, somatik embriyogenez, mikroaşılama ve hatta protoplast kültürleri bile, *P. vera, P. khinjuk, P. atlantica, P. mutica* ve *P. terebinthus* gibi diğer *Pistacia* türleri için mikroçoğaltım geliştirilmeye çalışılmıştır (**Özden-Tokatli ve ark. 2010**).

Antepfıstığıyla ilgili ilk *in vitro* çalışma **Barghchi** (**1982**) tarafından sürgün ucu kültürü yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu mikroçoğaltım çalışmasıylı birlikte antepfıstığının vejetatif çoğaltımı için alternatif doku kültürü yöntemlerinin geliştirilmesinin temelleri atılmıştır. Ülkemizde ise **Çetiner ve ark.** (**1997**) yılında yine *P. atlantica* üzerine yapılmıştır.

Farklı zaman periyotlarında kök ve sürgünlerin farklılaşmaları organojenez olarak ifade edilir. Genellikle sürgünlerin uyarımı dokularda bulunan sitokinin hormonu ile uyarılır. Yetişkin materyalde kültür başlatılması genellikle budama, aşılama, BA ve GA_3 püskürtme yöntemi, olgun ağaçlardaki sürgünlerin yeniden büyümelerini teşvik edebilir (**Barghchi ve Martinelli 1984; Barghchi ve Alderson 1989; Gonzales ve Frutos 1990**). Olgun antepfıstığı ağaçlarının ilk eksplantlarından gerçek aksiller sürgün oluşumu üzerine çalışma rapor edilmiştir (**Onay 2000a**). Maksimum sürgün üretimi 8.8 µM BA içeren MS besi ortamından elde edilmiştir. Rejenerasyon oranı kültürün 30. gününde her bir bitki materyal için 20 mikro sürgün olarak ölçülmüştür. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi, MS ortamının 2 mgl^{-1} IBA ile desteklenmesi yoluyla başarılmıştır. Kısa süreli aklimitasyon sonrası köklenmiş bitkilerin bağımsız büyümeleri gerçekleştirilmiştir.

Somatik embriyojenezle mikroçoğaltım embriyojenik somatik hücrelerden embriyoların gelişimini gerektirir. Antepfıstığının somatik embriyojenez yoluyla miktoçoğaltımı; zigotik embriyolardan ve olgunlaşmamış kotiledonlardan başlatılmıştır (**Onay ve ark. 1995; Onay 1996**).

Pistacia ağaçlarının mikroçoğaltımı için genellikle Murashige ve Skoog kültür besi ortamı kullanılmıştır. (**Barghchi 1982; Martinelli 1988; Abousalim 1990**). **Barghchi** (**1986a**) tarafından yapılan *P. vera*'nın sürgün performansı çalışmalarında;

MS besi ortamı ile Llyod, McCown ve Woody Plant Medium besi ortamları arasında fark olmadığı tespit etmiş ve bu nedenle de antepfıstığının daha sonraki *in vitro* kültür çalışmalarında MS besi ortamı kullandığını bildirmiştir.

Bustamante-Garcia (**1984**), antepfıstığı dokularındaki sürgünlerin hangi besi ortamında daha iyi geliştiğini belirlemek için; 6 farklı temel besi ortamına (G5, Cheng, Modifiye Ericson, Heller, White and Woody Plant) eksplantları almışlar ve en iyi ortamın filtre kağıdı köprüleri kullanılarak modifiye edilmiş Ericson sıvı ortamı olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte sürgün çoğaltımı safhasında 4 farklı ortam kullanılarak karşılaştırmalı bir çalışma da yapılmıştır (**Abousalim 1990**). Antepfıstığının sürgün çoğaltımı için MS ortamı ile WPM, (K) Knop ve (A) Alderson'un formülasyonları karşılaştırıldığında MS ortamının üstünlüğünü ispat etmiştir.

Bitkilerin mikroçoğaltımında kullanılan diğer bir yöntem, adventif organogenesisdir (**Özden-Tokatli ve ark. 2010**). Antepfıstığında tomurcukların yeniden gelişimi, farklı bitki organları aracılığıyla olabilmektedir (**Barghchi ve Alderson 1989; Onay ve ark. 2003a; Onay ve ark. 2004; Onay 2005; Hormaza ve Wünsch 2007; Tilkat ve ark. 2009a**).

Melez antepfıstığı tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi **Çalar ve ark.** (**2015**) tarafından ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir. *İn vitro* kültürlerin başlatılması için 6 melez genotipe ait tohumlar 1 mg/l BAP içeren ve içermeyen MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Melez tohumların çimlenme oranı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve sürgün ucu kararması gibi özellikleri belirlenmiştir. BA bulunmayan ortamda çimlenme oranı %46 ile %94 arasında değişirken, sürgün uzunluğu 10.97-55.54 mm, kök uzunluğu 15.53-146.53 mm, nod sayısı 3.33–10.00 arasında gerçekleşmiştir. BAP bulunan ortamda çimlenme oranı %26.32 ile %100 arasında değişirken, sürgün uzunluğu 7.88-23.55 mm, kök uzunluğu 7.83-44.23 mm, nod sayısı 3.0-7.88 arasında gerçekleşmiştir.

Antepfıstığı rejenerasyonunda kullanılan diğer bir yöntem mikroaşılama, yöntemdir. 1980'lerde geliştirilen mikroaşılama yöntemi (**Jonard 1986**), aseptik koşullar altında çok küçük bir aşı kaleminin *in vitro* ya da *in vivo* koşullarda gelişen anaç üzerine yerleştirilerek uygulanmaktadır. Mikroaşı yöntemi hastalıklardan ari

bitkilerin üretilmesi, yaşlı materyalin gençleştirilmesi ve/veya canlandırılması gibi çeşitli çalışmalarda kullanılabilmektedir (**Abousalim ve Mantell 1992; Onay ve ark. 2003b**).

Juvenil antepfıstığı anaçları üzerine, *in vitro* olgun sürgün ucu aşı kalemlerinin aşılanması ile ilgili ilk çalışma **Barghchi** (**1986b**), tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, *in vivo'*nun yanı sıra *in vitro* mikroaşılama da denenmiş, ancak olgun ağaçlar aşı kalemi olarak kullanıldığında gençleştirme gerçekleşememiştir (**Abousalim ve Mantell 1992**). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, *in vivo'*nun yanı sıra *in vitro* mikroaşılama yöntemleri başarılı bir şekilde antepfıstığına uygulanmıştır (**Onay ve ark. 2003b, 2004; Onay ve Tilkat 2006; Çalar 2013**).

Sakız ağacının *in vitro* mikroaşılanması için **Çalar** (**2013**) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* ortamda yetiştirilen sakız ağacı sürgünlerinin dört farklı *Pistacia* türü üzerine mikroaşılaması yapılmıştır. Bu çalışmada antepfıstığı, buttum, atlantik sakızı ve melengiçe ait tohumlar *in vitro* çimlendirilerek anaç olarak kullanılırken, çelik olarak laboratuvarda 1 yıl alt kültürlenmiş sakız ağacının sürgünleri kullanılmıştır.

Antepfıstığı (*P. vera*) 'Siirt' çeşidinin *in vitro* mikroçoğaltılmı için, ürün veren ağaçlardan alınan eksplantların rejenerasyonu *in vitro* mikroaşılama metodu ile gerçekleştirilmiştir (**Onay ve ark. 2003**) ve bu çalışmayla budanmış ağaçlardan, köke en yakın kısımdaki yeni apikal sürgünlerden alınan eksplantların, 1 mgl^{-1} BA, 100 mgl^{-1} kazein hidrolizat, 30 gl^{-1} sakkaroz ve 8 gl^{-1} agar içeren 1/1 konsantrasyonundaki MS besi ortamında en iyi rejenerasyonu gösterdiği tespit edilmiştir.

Birçok meyve ağacı gibi antepfıstığında da köklenme çok zor olması nedeniyle vejatatif üretim için anaçlara gereksim duyulmaktadır. *Pistacia* yetiştirmede en önemli faktör anaç - gövde uyumudur (**Ferguson ve ark. 2005**). Atlantik sakızı, *P. integerrima* Stewartson, antepfıstığı, melengiç dünya çapında en fazla kullanılan anaçlardır. Önemli bir şekilde, UCB-1 ve PG II (*P. atlantica* × *P. integerrima*) oldukça yaygın kullanılmaktadır (**Couceiro ve ark. 2013; Ferguson ve ark. 2005**). Kendi türleri arasında hiçbir çaprazlama engeli olmaksızın (**Parfitt 2003**) *Pistacia* cinsinde hibrit oluşumu yoğun olarak meydana gelmekte ve çalışmalar yoluyla belgelenmektedir (**Zohary 1952**). UCB-1 hibrit anacı seçilmiş dişi *P. atlantica* ağacı ile erkek *P.*

integerrima ağacı arasında kontrollü tozlaşma ile Berkeley Üniversitesinde (Kalifornia, USA) 1960 yılında (**Ferguson ve ark. 2008**) oluşturulmuştur.

İspanyada yapılan bir çalışmada (Castilla-La Mancha) *P.terebinthus* ile *P. integerrima, P. vera* ve *P. atlantica* kapalı tozlaşma ile çaprazlanarak farklı türler arası hibritler geliştirilmiştir. Çaprazlananların tümü kuvvetli genotipler, başarılı aşılama oranları ve *P. terebinthus* × *P. integerrima* hibriti hariç soğuğa dirençli genotipler oluşturulmuştur (**Couceiro ve ark. 2013**). Ayrıca açık tozlaşma ile üretilen *P. vera* × *P. atlantica* hibritleri ve daha kuvvetli daha büyük tohumlar oluşturmuştur (**Couceiro ve ark. 2013**).

2.4. Moleküler Belirteçler ile İlgili Genel Literatür Özeti

2.4.1. Somaklonal Varyasyonlar

Son yıllarda bitki moleküler genetiğindeki ilerlemeler katlanarak artmaktadır. Moleküler belirteçler (izomerler, RFLP, RAPD gibi PCR'a dayalı belirteçler) doku kültürü çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel çoğaltım metodlarının dışında *in vitro* kültür metotları (aksillar tomurcuk oluşumu, adventif tomurcuk oluşumu, somatik embriyojenez vb.) odunsu bitkilerin vejetatif çoğalması için genellikle umut verici teknikler olarak kabul edilirler (**Von Arnold 1988; Cheliak ve Rogers 1990, Thorpe ve ark. 1991; Jain ve ark. 1995; Smith 1997; Jain ve Ishii 1998**). Dahası bu metodlar genetik transformasyon çalışmaları için rejenerasyon modeli olarak halihazırda kullanılmaktadır (**Leple ve ark. 1992; Donahue ve ark. 1994; Wang ve ark. 1996; Levee ve ark. 1997; Walter ve ark. 1998**). Bununla birlikte *in vitro* kültürde çoğaltılmış bitkiler somatik varyasyon olarak adlandırılan fenotipik farklılıklar sergileyebilir (**Larkin ve Scowcroft 1981**). Somaklonal varyasyon ya *in vitro* kültür sisteminde kendiliğinden ya da somatik hücrelerde önceden var olan fizyolojik ya da genetik varyasyonun sonucudur (**D'Amato 1985; Swartz 1991**). Embriyojenik hücre hatlarının rejenerasyon kapasitelerinin azalmasıyla ya da kaybıyla sıklıkla somaklonal varyasyonlara atfedilir (**Dunstan ve Bethune 1996; Fourre ve ark. 1997; Roth ve ark. 1997**). **Braun** (**1959**), tarafından somaklonal varyasyonun ilk gözleminden ve raporundan beri, bu varyasyonların doku kültürü ile çoğaltılan bitkilerinin genetik bütünlüğünün kaybı açısından endişe oluşturmaktadır.

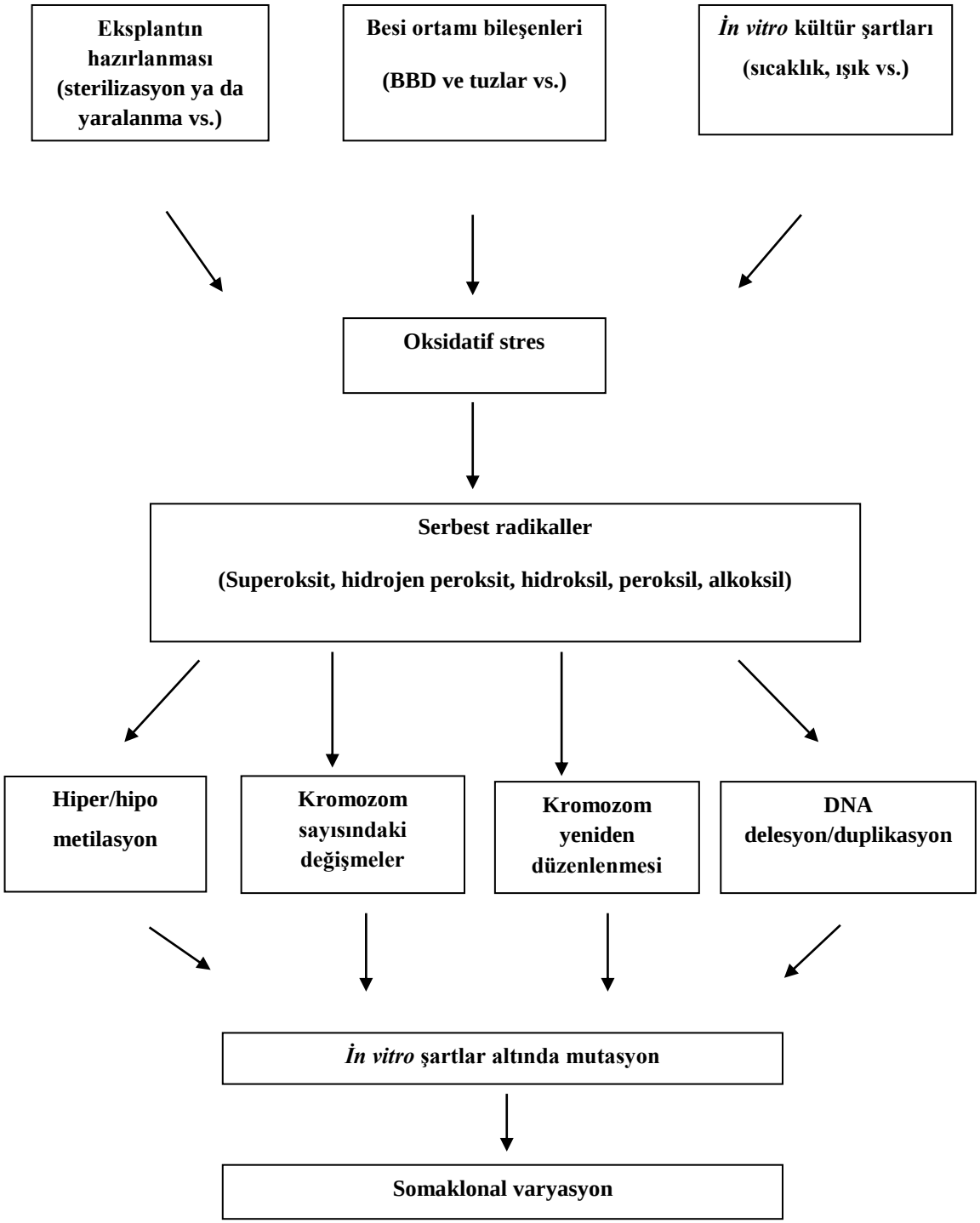
Doku kültürü tekniklerinde meydana gelen gelişmeler, çok sayıda bitki türü için ticari ölçüde çoğaltılması mümkün olan bir *in vitro* çoğaltım protokolü olarak çeşitli bahçe bitkilerinde de rejenerasyonu mümkün kılmaktadır. Klonal çoğaltım, seçkin genotip seçimi ve üstün karekterlilerin seçimi, rejenere edilmiş bitkiler arasında homojenitenin yüksek derecesini gerektirir. Bununla birlikte bitki doku kültürleri epigenetik değişiklik ya da gen mutasyonlarının bir sonucu olan somaklonal varyasyonlar yoluyla genetik çeşitliğe de katkı sağlayabilir. Tanımlanmamış somaklonal varyasyonların ortaya çıkması germplazm muhafazasının yanı sıra *in vitro* klonlama için dezavantajdır. Bu nedenle somaklonal varyasyon erken bir aşamada *in vitro* çoğaltılmış bitkilerin genetik homojenliği sağlamak için büyük önem taşımaktadır. Morfolojik-fizyolojik, biyokimyasal, sitolojik ve DNA tabanlı moleküler belirteç yaklaşımları içeren çeşitli stratejiler; *in vitro* çoğaltılmış progenlerin genetik uygunluğunu belirlemek için kullanılmıştır. Somaklonal varyasyon herhangi bir mikroçoğaltım programında ciddi bir sorun olarak ortaya çıkabilir. Diğer taraftan somaklonal varyasyon ya ıslahı zor ya da sınırlı bir genetik çeşitliliğe sahip bahçe bitkilerinde, sofistike teknolojiye ihtiyaç duymadan hızlı şekilde genetik çeşitlilik elde edilmesi bakımından ıslahçılar için yeni ve alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmektedir.

Bitki doku kültürü teknikleri bahçe bitkilerinin vejetatif çoğaltılmasına alternatif bir yöntemdir (**Krishna ve ark. 2005; Alizadeh ve ark. 2010**). Doku kültürü yoluyla klonal propagasyon (bilinen adıyla mikroçoğaltım) küçük bir alan içinde hızlıca gerçekleştirilebilir (**Krishna ve ark. 2008; Eftekhari ve ark. 2012**). Bir klon populasyonu içinde her bir bitkinin uniform olması ticari üretimde klonal çeşitlerin en büyük avantajıdır (**Krishna ve Singh 2013**). Ancak genetik varyasyonlar farklılaşmamış hücrelerde, izole edilmiş protoplaslarda, kalluslarda, dokularda ve *in vitro* çoğaltılmış bitkilerin morfolojik özelliklerinde ortaya çıkabilir (**Bairu ve ark. 2011; Currais ve ark. 2013**). **Larkin ve Scowcraft** (**1981**), hücre ve doku kültürünün herhangi bir formundan elde edilmiş bitki varyasyonları için genel bir terim olarak **somaklonal varyasyon** terimi kullanılmaktadır. Günümüzde çilek, papaya, muz, üzüm, ananas, turunçgil, domates, hıyar, kavun, ormangülü ve orkide gibi mikroçaoğaltılmış çeşitlerde geleneksel yollarla çoğaltılmış bitkilere göre daha fazla görülür. Bununla birlikte şimdiye kadar 1971'de (**Heinze ve Mee 1971**) *in vitro* üretilen şeker pancarı bitkilerinde morfolojik çeşitliliğin resmi olarak ilk rapor edilmesinden bu yana

somaklonal varyasyonların farklı bahçe bitkilerinde gözlendiği rapor edilmiştir. Somaklonal varyasyonlar çok büyük arazi koşulları ve zaman gerektiren çok yıllık bitkilerin çaprazlanmasının aksine, *in vitro* da istenilen özelliklerin gözle görülebilmesi için çok daha az yer ve zaman gerektirir.

2.4.1.1. Bitki Doku Kültüründe Ortaya Çıkan Varyasyon Nedenlerinin Belirlenmesi

Doku kültürü klonal çoğaltımın etkili bir metodu olmakla birlikte, elde edilen rejenerantlar genellikle bir dizi somaklonal varyasyonlara sahiptir (**Larkin ve Scowcroft 1981**). Bu somaklonal varyasyonlara ağırlıklı olarak doku kültürü işlemleri sırasında ortaya çıkan mutasyonlar neden olur **(Sato ve ark. 2011b**). Doku kültüründe mutasyonları tetikleyenler; tamamlanmayan dokular (protoplastlar gibi), sterilizasyon sırasında sterilanta maruz kalması ve yaralanmaları içeren çok sayıda stres faktörleri, bitki büyüme düzenleyicilerin (oksin ve sitokinin gibi) yüksek konsantrasyonları gibi ortam bileşenlerinin dengesizliği, yapraklardaki fotosentez yerine besi ortamındaki şeker, aydınlatma koşulları, yüksek nem ve terleme arasındaki bazı fizyolojik ilişkiler şeklinde sıralanabilmektedir (**Joyce ve ark. 2003; Sato ve ark. 2011b; Smulders ve de Klerk 2011**).



Şekil 2.1. *İn vitro* kültürde oksidatif stresin bir sonucu olarak mikroçoğaltılmış bitkilerde ortaya çıkan olası somaklonal varyasyon mekanizması

Mikroçoğaltılmış bitkilerde meydana gelen değişikliklerin çoğu *in vitro* kültür sırasında bitki dokularının oksidatif stres hasarı ile ilişkili olabilir (**Cassells ve Curry 2001; Tanurdzic ve ark. 2008; Nivas ve DSouza 2014).** Pro-oksidanlar veya

süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin varlığı (ROS) bitkilerde oksidatif stres ile sonuçlanabilir. Bu reaktif oksijen türleri (ROS) DNA'nın hiper veya hipo metillenmesinde değişikliklere (**Wacksman 1997**), anoploididen poliploidiye kromozom sayısında değişmelere, kromozom iplik kırılması, kromozomun yeniden düzenlenmesi, DNA bazlarında delesyonlar, duplikasyonlar ve yer değiştirmelere (**Czene ve Harms-Ringdahl 1995**), *in vitro* bitki hücrelerinde mutasyonlara yol açabilmektedir (Şekil 2.1.).

- Eksplant Kaynağı

Farklı doku kaynaklarından rejenerasyon başarıldığında somaklonal varyasyonun hem doğasında hem de meydana gelme sıklığında değişimler ortaya çıkabilir (**Sahijram ve ark. 2003**). Bitki doku kültürleri kök, yaprak ve gövde gibi yüksek oranda farklılaşmış dokulardan başlatıldığında, aksillar tomurcuk, sürgün ucu gibi daha önceden varolan meristem eksplantlarından başlatılan bitki kültürlerine oranla somaklonal varyasyona daha yatkındır (**Duncan 1997**). Daha yaşlı ya da daha fazla özelleşmiş dokular kullanıldığında rejenere olmuş bitkilerde somaklonal varyasyona rastlanması daha sıktır (Çizelge 2.3.). Adventif sürgün rejenerasyonunda (sürgün organogenesiz) kallustan doğrudan ya da dolaylı şekilde oluşan yapılar da (yapraklar, petiol, nodlar arası sürgünler, kök parçaları, anterler, hipokotiller ve kotiledonlar vb.) somaklonal varyasyona yol açabilir (**Pijut ve ark. 2012**). Somaklonal varyasyon ayrıca bitkide zaten mevcut olan (kimera gibi) yapılardan dolayı da ortaya çıkabilir (**Karp 1994**).

-Kültür Periyodunun Uzunluğunun ve Alt Kültür Döngü Sayısının Etkisi

İn vitro ortamda kültürler daha uzun süre muhafaza edilirse, somaklonal varyasyon oluşma oranı artabilir (**Kuznetsova ve ark. 2006; Gao ve ark. 2010; Farahani ve ark. 2011; Jevremović ve ark. 2012; Sun ve ark. 2013**). Dahası mikroçoğaltım sırasında bir dokunun hızlı çoğaltımı genetik kararlılığı etkileyebilmektedir. **Khan ve ark.** (**2011**) tarafından rapor edilen bir çalışmada 8. altkültürden sonra muzda sürgünlerin çoğalma hızında eş zamanlı bir azalma ile somaklonal varyasyon oranında artış olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde **Clarindo ve ark.** (**2012**) kahvenin 4 aydan daha az süre altkültürlenen süspansiyon kültürlerinin değişikliğe uğramadığını ve uzun süreli *in vitro* kültürlerde poliploidi gözlendiğini

belirtmiştir. Aynı şekilde **Farahani ve ark.** (**2011**) tarafından yapılan çalışmada, zeytin çeşitlerinde, aynı *in vitro* koşullar altında internodlar ile daha sonra RADP analizi ile teyit edilen 7. altkültürden sonra rejenere olmuş bitkiler arasında morfolojik karekterlerde önemli farklılıklar gözlemlemiştir. Özellikle hücre süspansiyon ve kallus kültürlerinde sadece altkültür sayısı değil aynı zamanda altkültürleme sürelerinin de somaklonal varyasyon oranının artmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (**Bairu ve ark. 2006; Sun ve ark. 2013**). Çalışmalar somaklonal varyasyonun uzun süreli kültürlerden rejenere olan bitkilerde daha çok görülebilir olduğunu göstermiştir (**Etienne ve Bertrand, 2003**). **Rival ve ark.** (**2013**), DNA metilasyonundaki değişikliklerin palmiye ağaçlarının doku kültürleri sırasında embriyonik kapasitenin rejenerasyonu ile oransal ilgili olduğunu ve DNA hipermetilasyonunu zamana bağlı olarak uyardığı bildirilmektedir.

- Genotip ve Poliploidi

Kullanılan besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* morfogenezi etkilediği belirtilmiştir (**Alizadeh ve ark. 2010; Eftekhari ve ark. 2012**). Somaklonal varyasyonları etkileyen faktörler arasında bitki genotipi varyasyonun belirlenmesinde en önemli belirleyicilerindendir (**Shen ve ark. 2007; Tican ve ark. 2008; Nwauzoma ve Jaja 2013**). Daha önce **Eeuwens ve ark.** (**2002**) palmiye ağacında *in vitro* koşullardaki çiçeklenme verilerine dayanarak ‘manto’ çiçeklenme ile (hem erkek hem dişi çiçeklerde anter primordiyası etli tamamlayıcılarla çevrili) ilgili olarak somaklonal varyasyonu düşük/orta ve yüksek risk olarak sınıflandırmışlardır.

Çizelge 2.3. Eksplant seçiminin somaklonal varyasyona etkileri

Bitki türleri	**Eksplant kaynağı**	**Somaklonal varyasyon durumu (+/-)**	**Referans**
Afrika menekşesi (*Saintpaulia* sp.)	Yaprak parçaları	+	Matsuda ve ark. (2014)
Badem (*Prunus dulcis*)	Aksillar dallar	-	Martins ve ark. (2004)
Kimerik "maricongo" muzu	Bitki ve çiçek ekseni ucu	+	Krikorian ve ark. (1993)
Muz (*Musa* sp.)	Kimerik sürgün ucu	+	Israeli ve ark. (1995)
Muz (Martaman türü)	Sürgün ucu	-	Ray ve ark. (2006)
Patlıcan (*Solanum melongena*)	Hipokotil	-	Mallaya ve Ravishankar (2013)
Patlıcan (*Solanum melongena*)	Yaprak, nod ve internodlardan uyarılan kalluslar	+	Naseer ve Mahmood (2014)
Kasımpatı (*Dendranthema grandiflora*)	Yaprak ve internodlardan olaşan kallus	+	Miler ve Zalewska (2014)
Avrupa menekşesi (*Viola uliginosa* Besser)	Yaprak ve petiolparçaları	+	Slazak ve ark. (2015)
Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus)	Kapitulum	-	Bhatia ve ark. (2009, 2011)
Gloksinya	Yaprak eksplantı	+	Hu ve Xu (2010)
Şerbetçi otu (*Humulus lupulus* L.)	Meristem dokuları	-	Patzak (2003)
Havlıcan (Kaempferia galanga)	Rizom tomurcukları	-	Mohanty ve ark. (2011)
Kivi (*Actinidia deliciosa* cv. "Tomuri"	Yaprak ayası ve sapı	+	Prado ve ark. (2007)
Palmiye (*Elaeis guineensis* Jacq.)	Olgun zigotik embriyolar	+	Rival ve ark. (2013)
Palmiye (*Elaeis guineensis* Jacq.)	Olgunlaşmamış zigotik embriyolar	+	Sanputawong ve Te-chato (2011)
Palmiye (*Elaeis guineensis* Jacq.)	Olgunlaşmamı yapraklar	+	Lucia ve ark. (2011)
Papaya (*Carica papaya* L.)	Kriyopreservasyon yapılmış aksillar sürgün ucları	+	Kaity ve ark. (2009)
Paçuli (*Pogostemon patchouli*)	Yapraka ekplantı ve internodlardan uyarılmış kallus	+	Ravindra ve ark. (2012)
Patates (*Solanum tuberosum*)	Gövde ekplantından kallus kültürü	+	Thieme ve Griess (2005)
Kiraz (*Prunus avium*)	Apikal sürgün kısımları	+	Piagnani ve Chiozzotto (2010)
Erik (*Prunus cerasifera* Erhr)	Yaprak	+	Muleo ve ark. (2006)
Swertia chirayita	Aksillar çoğaltma	-	Joshi ve Dhawan (2007)
Zerdeçal (*Curcuma longa* L.)	Rizomun lateral aksillar tomurcuğu	-	Nayak ve ark. (2010)
Zerdeçal (*Curcuma longa* L.)	Filizlenmemiş rizomun aksillar tomurcuğu	-	Panda ve ark. (2007)
Zerdeçal (*Curcuma longa* L.)	Rizom parçalarından başlatılan kallus kültürleri	+	Kar ve ark. (2014)
Üzüm *(Vitis* spp.)	Nodal segment	–	Alizadeh ve ark. (2008)

-Kültür Ortamı

Bitki büyüme düzenleyicileri, sıcaklık, ışık, ozmolarite, nem ve besi ortamının karıştırılma oranı gibi dış faktörlerin bitkilerde *in vivo* hücre döngüsünü etkilediği bilinmektedir (**Karp 1994; Nwauzoma ve Jaja 2013**). *İn vitro* hücre döngüsünün eksik kontrolü de somaklonal varyasyonun nedenlerinden biridir. DNA replikasyonu tamamlanmadan önce hücre bölünmesini engelleyen normal hücre döngüsü

kontrollerinin doku kültürleri sırasında bozulması da kromozom kırılmalarıyla sonuçlanır (**Phillips ve ark. 1994**). Kromozom kırıkları ve bu kırıklara bağlı olarak baz eklenmeleri, çıkarılmaları gibi nedenler de *in vitro* sapmalara neden olur (**Duncan 1997**). Bitki büyüme düzenleyicileri somaklonal varyasyon hızını hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkileyebilir (**Gao ve ark. 2010**). **D'Amato** (**1985**) tarafından yapılan çalışmada, bazı bitki büyüme düzenleyicileri belli kombinasyonlarda veya konsantrasyonlarında, ya bitki büyüme düzenleyicileriyle ya da bir kültür ortamının belli bileşenleri ile mutajenler gibi hareket edebileceğini rapor etmiştir. 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4 D), naftalen asetik asit (NAA), BAP (6-benzylaminopurine), sentetik fenilüre türevleri (4-CPPU, PBU ve 2,3-MDPU) gibi çeşitli büyüme düzenleyicilerinin genetik değişkenlikten sorumlu olduğu kabul edilir (**Siragusa ve ark. 2007; Sun ve ark. 2013; Sales ve Butardo 2014**). 2,4-D içeren besi ortamında uzun süreli altkültürleme kallus hücrelerinde ploidi seviyesini yüksek oranda etkiler (**da Silva ve Carvalho 2014**). **Sales ve Butardo** (**2014**) tarafından yapılan çalışmada**,** muz kültür ortamına 2,4 D eklenmesinin yüksek oranda metilasyona neden olduğu ve böylelikle doku kültüründe yetiştirilen bu bitkilerde varyasyonla sonuçlandığı gözlenmiştir. DNA metilasyon oranındaki değişiklikler palmiye ağacında somaklonal varyasyona neden olur (**Eeuwens ve ark. 2002; Jaligot ve ark. 2011**). Benzer şekilde **Arnhold-Schmitt** (**1993**), besi ortamında IAA ve inositolün havuç kallus kültürlerinde metilasyon değişikliği ve DNA'nın yeniden düzenlenmesini uyardığını gözlemlemiştir. **Matsuda ve ark.** (**2014**), afrika menekşesinin yaprak ve yaprak parçaları ile inoküle edilmiş besi ortamına bitki büyüme düzenleyicileri (0.5 ppm BA ve 0.1 ppm NAA) eklendiğinde somaklonal varyasyon oranının artığını rapor etmiştir. **Arnhold-Schmitt** (**1993**) tarafından kinetinin iki haftalık havuç kök eksplantlarının proliferasyonunda DNA'nın hipermetilasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca oksinler, örneğin NAA içerenler ortamda büyütülen *in vitro* kültürlerde ise aksine hipometilasyon neden olduğu gözlenmiştir (**LoSchiavo ve ark. 1989**).

2.4.1.2. Doku Kültüründe Varyasyonun Belirlenmesi

Somaklonal varyasyon fenotipik, sitolojik, biyokimsal ve genetik/epigenetik değişiklikler şeklinde karekterize edilebilir (**Kaeppler ve ark. 2000**).

Özellikle morfolojik özelliklerdeki farklılıklara (**Pérez ve ark. 2009; 2011; Nhut ve ark. 2013**) dayalı olan somaklonal varyasyonların karekterize edilmesi ve belirlenmesi amacıyla çok çeşitli araçlar bulunmaktadır. Kromozomdaki yapısal ve sayısal varyasyonların belirlenmesi için sitogenetik analizler (**Clarindo ve ark. 2012; Currais ve ark. 2013; Abreu ve ark. 2014**), biyokimyasal (**Vujovic ve ark. 2010; Kar ve ark. 2014**) ve DNA belirteçleri (**Krishna ve Singh 2007; Pathak ve Dhawan 2012; Hossain ve ark. 2013; Bello-Bello ve ark. 2014**) veya bu yöntemlerin kombinasyonlarının (**Horáček ve ark. 2013; Dey ve ark. 2015; Stanišić ve ark. 2015**) kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Somaklonal varyasyonun belirlenmesi için özellikle odunsu meyve türlerinde uzun dönemli değerlendirmelerin yapılması gerekmektedir (**Grosser ve ark. 1996**). Yukarıda bahsi geçen yöntemlerin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır.

Bazı somaklonal varyasyonlar doğal olarak epigenetik olup, geleneksel yapıda moleküler belirteçler ile belirlenemez (**Jaime ve ark. 2007**). Bu durumlarda metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizm (MSAP) (**Jaligot ve ark. 2003**; **Hao ve ark. 2004**), metilasyona duyarlı restriksiyon parçası uzunluk polimorfizm (RFLP) **(Jaligot ve ark. 2002)** ya da gen ekspresyon yaklaşımı (**Morcillo ve ark. 2006**) gibi yöntemlerin kullanımına ihtiyaç duyulur. Ek olarak, doku kültürü sistemlerinin bitkilerin taşınabilir elementlerinin transpozisyonunu uyardığı gösterilmiştir (**Hirochika ve ark. 1996; Courtial ve ark. 2001**). Bunların yeni bölgelere eklenmesi somaklonal varyasyon ile sonuçlanmaktadır (**Wessler ve ark. 1995**).

2.4.1.3. Somaklonal Varyasyonun Moleküler Temeli

Tek bir bitki genotipinin aynı *in vitro* kültür koşulları altında nasıl farklı fenotiplerle sonuçlanabildiği hala anlaşılamamıştır. Somaklonal varyasyonlar kromozom sayısındaki değişiklikler (**Mujib ve ark. 2007; Leva ve ark. 2012**), nokta mutasyonları (**D'Amato 1985; Ngezahayo ve ark. 2007**), somatik krosing over ve kardeş kromatit değişimi (**Duncan 1997; Bairu ve ark. 2011**), kromozom kırılması ve yeniden düzenlenmesi (**Czene ve Harms-Ringdahl 1995; Alvarez ve ark. 2010**), somatik genlerin yeniden düzenlenmesi, DNA amplifikasyonu (**Karp 1995; Tiwari ve ark. 2013**), organel DNA'sında değişiklikler (**Cassells ve Curry 2001; Bartoszewski ve ark. 2007**), DNA metilasyonu (**Guo ve ark. 2007; Linacero ve ark. 2011**),

epigenetik varyasyon (**Kaeppler ve ark. 2000; Guo ve ark. 2006; Smulders ve de Klerk 2011**), histon modifikasyonları ve RNA etkileşimi (**Miguel ve Marum 2011**), önceden var olan kimeral dokuların segregasyonu (**Brar ve Jain 1998; Vázquez 2001; Ravindra ve ark. 2012; Nwauzoma ve Jaja 2013**) ve transpozonların eklenmesi veya çıkarılması (**Gupta 1998; Sato ve ark. 2011b**) gibi çeşitli şekillerde kendini gösterebilir. Özellikle tranpozon elementleri *in vitro* kültürde genetik yeniden düzenlenmelerin nedenlerinden biridir (**Hirochika ve ark. 1996; Sato ve ark. 2011a**).

Doku kültürünün somaklonal varyasyon ile sonuçlanan sessiz tranpozon elementleri aktive ettiği bilinmektedir. Bu elementlerin aktivasyonu normal koşullarda kromozomun yeniden düzenlemeleriyle sonuçlanabilmesine karşın; doku kültürü koşullarında retrotranspozonlar ve transpozon elementlerinin katılımı bitki genomundaki mutajenler olarak da işlev görebilir (**Tanurdzic ve ark. 2008**). Bu yeniden düzenlemeler, anoploidi, yeni transpozon eklenmesi ve genlerin yanlış düzenlenmesine yol açabilir (**Smulders ve de Klerk 2011**). Bununla birlikte somaklonal varyasyonlara neden olan mekanizmalar birçok açıdan henüz tanımlanmamıştır. Böylece ilgili ürünün bütün genomunun dizilenmesi (dizileme, tarama) yoluyla büyük genom değişikliği ortaya çıkarılması kaçınılmaz görünmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojisi bireysel bitkilerin tüm genomunun dizilemesini yapabilir (**Miyao ve ark. 2012**). Yeni nesil sekanslama (dizileme, tarama) teknolojisi Illumina/Solexa, ABI/SOLiD, 454/Roche, ve Helicos sistemi bitkilerden yüksek verimli genomik araştırma için görülmemiş fırsatlar sağlamaktadır (**Morozova ve Marra 2008; Metzker 2010**).

2.4.1.4. Somaklonal Varyasyonlar Aracılığıyla Ürün Islahı

Genetik varyasyon herhangi geleneksel bir ürün ıslah programının temel bileşenidir. Tipik bir bitki gelişme döngüsünün tamamlanması 10-15 yıl alır ve germplazm manipulasyonu, genotip seçimi ve kararlılığı, çeşit denemesi, çeşit artması, özel bir koruma ve bitkisel üretim aşamalarını içerir. Bitki doku kültürü birçok yeni araçların bitki ıslahçılarına yardımcı olmak için geliştirilmesine fırsat veren bir teknolojidir (**Karp 1992; Mathur 2013**). Doku kültürü kaynaklı somaklonal varyasyon kimyasal ve fiziksel mutajenler ile uyarılmış varyasyonlara yakındır (**Jain 2001**). Bitki ıslahında varyasyonlardan potansiyel olarak faydalanabilmek için doğal çeşitliliği ortaya

çıkarmaya bir fırsat sunmaktadır. Farklı teknolojilerin kullanımında olduğu gibi *in vitro* kaynaklı somaklonal varyasyon da bazı avantaj ve dezavantajları sahiptir.

-Avantajları

1. Diğer manipulasyon metotlarından daha ucuz olup, önleme prosedürleri gerektirmez.
2. Doku kültürü sistemleri şu anda somatik hibridizasyon ve transformasyon ile ayarlanabilir olmasından dolayı çok daha fazla bitki türü için kullanımı mevcuttur.
3. Aslında transformasyonda izole olmuş ve klonlanmış olan özelliklerin genetik tabanda belirlenmesine gerek yoktur.
4. Yapılan çalışmalar sonucunda somaklonlar arasından yeni çeşitlerin geliştirildiği bildirilmektedir. Genetik rekombinasyonun hem sıklığı hem de dağılımı doku kültürü boyunca genlerin değiştirilebilir olduğunu kanıtlamaktadır (**Karp 1992**). Varyasyonun, geleneksel ve mutasyon ıslahı ile ortaya çıkan genomun farklı bölgelerinden elde edilebilir olduğu açıktır.
5. Eğer somaklonlar doku kültürü yoluyla yetiştirilmişse, kimerik ekpresyon gerçekleşmez (**Evans 1989**).

Somaklonal varyasyonlar dar genetik tabanlar ve sınırlı genetik sistemler ile bitkilerde çok başarılı olmuştur. Örneğin süs bitkilerinde *in vitro* oluşturulan çeşitliliğin faydası birçok ticari işletmelerin rutin ıslah uygulamalarının bir parçası haline gelmiştir.

-Dezavantajları

Belirli bitki türlerinin varyasyonunu etkileyen faktörlerin belirlenmesine rağmen, bu kullanımı nispeten zor hale getiren somaklonal varyasyonun en ciddi sınırlamalarından biri rastgele veya yeniden üretimin yetersizliği gibi somaklonal varyasyon programının (**Karp 1992**) sonucununun hala tahmin edilmesinin mümkün olmamasıdır. Dahası çok sayıda genetik değişiklik nokta mutasyonlarına ya da kromozom yeniden düzenlenmelerine dayalı olup çoğu 1. kuşaktan (R1) ayrıdır. Bu nedenle verim gibi nicel özellikler için 1. kuşakdaki iyileştirmelerle bireyleri seçmek hemen hemen imkansızdır. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı somaklonların seçimi için tüm teknikler birçok bahçe bitkisi üzerinde uygulanmaktadır,

ancak herhangi bir *in vitro* seçim yöntemi; verim, kuru madde oranı, tat, doku ya da raf ömrü gibi karışık özellikler için mevcut değildir (**Evans 1989**).

Somaklonal varyasyonlar kalıtsal olarak karalılıkları olması koşuluyla bitki ıslahının bir parçası olabilmektedir. Yalnızca sınırlı miktarda umut vadeden çeşitler için somaklonlar varyasyonların kullanılması uygun görülmektedir. Dahası yeni çeşitler somaklonal varyasyon tarafından üretilmiş olsa bile, çok sayıda geliştirilmiş varyantlar aşağıdaki sebeblerden dolayı seçilememektedir (**Karp 1992**);

a. Varyasyonların tamamı olumsuzdur.
b. Olumlu değişiklikler olumsuzluklarla değişmiştir.
c. Değişiklikler yeni değildir.
d. Çaprazlama ve kendine döllenmeden sonra değişimler stabil kalmamıştır.

2.4.1.5. Somaklonal Varyantların İyileştirilmesi

Çeşitlerin iyileştirilmesi, protoplast kültürü gibi somaklonal varyasyonların gelişiminden sorumlu olan faktörlerin teşvik edilerek (**Kothari ve ark. 2010**) ve uzun dönem kültürlerden çok sayıda bitkinin rejenerasyonu ve çok sayıda döngüsü için kallus ve hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak (**Barakat ve El-Sammak 2011**) geliştirilebilir. İndirekt organogenezis tarımsal veya endüstriyel kullanımında yararlı özellikleri olan somaklonlar aracılığıyla genetik varyasyonların üretiminde önemli bir araçtır. Bununla birlikte bitki genotipi somaklonal varyasyonun türünü ve sıklığını belirleyen en önemli faktördür. Örneğin domates (**Bhatia ve ark. 2005**) ve patates (**Sharma ve ark. 2007**) gibi *Solanaceous*ailesine ait bitkiler somaklonal varyasyonun her çeşidini göstermektedir. Bununla birlikte pratik değere sahip olması bakımından somaklonal varyasyon sıklığı istenilen özellikleri seçmede önemli bir kriterdir. Ayrıca seçilen hatların çoklu ortamlar altında en iyi performansa sahip olması önemli bir husus olarak karşımıza çıkmaktadır (**Duncan 1997**). *İn vitro* iyileştirilen çeşitlerin verim ve kalitesi başta olmak üzere istenilen özelliklerin taranması (biyotik ve abiyotik strese dayanıklılık) *in vitro* seleksiyon yoluyla daha da artırılabilir (**Barakat ve El-Sammak 2011**). Bu istenilen özelliklerin seçimi arazi koşullarında büyük üretimlere ihtiyaç duyulduğu ve yıllar aldığı gerçeği göz önüne alındığında büyük önem kazanmaktadır. *İn vitro* seleksiyon, minimal çevre etkileşimi ile *in vitro* seçim baskısı altında istenilen

özelliklerin seçimi için gereksinilen zaman büyük ölçüde kısaltılabilir ve tüm alan taranabilir.

Somaklonların iyileştirilmesi *in vitro* mutajenlerin uyarılması ve mikroçoğaltımla birleştirilerek artırılabilmesi muhtemeldir (**Afrasiab ve Iqbal 2010**). **Kuksova ve ark.** (**1997**), somaklonal varyasyon ve mutajenlerin uyarılmış mutasyon sıklığını birlikte arttırdığını bildirmektedir. Benzer şekilde adventif tomurcuk rejenerantlarının ışınlamasının ardından bahar yıldızı çiçeğinde (*Gypsophila paniculata* L.) de yararlı tarımsal özelliklerin mutajen varyetelerde iyileştiği bildirilmiştir (**Barakat ve El-Sammak 2011**).

2.4.1.6. Somaklonal Varyasyonların Uygulamaları

Doku kültürü ortamında ortaya çıkan eşsiz varyasyonların, bahçe bitkilerinde yeni tip ya da çeşitlerin bir kaynağı olarak avantajlı olarak kullanılabilmesi önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir (**Karp 1995**). Bununla birlikte dayanıklı klonların iyileştirilmesi ve belirlenmesi, tanımlanması ve bulunması için uygun araçların, varyasyonların etkisini gerçekleştirmek için tasarlanması gerekir (**Sahijram ve ark. 2003**). Somaklonal varyasyon ile verim artışı, kuraklık, tuzluluk, toprak pH'sı ve hastalıklara dayanıklılık gibi biyotik ve abiyotik strese dayanıklı bitkilerin eldesinde ıslahçılara büyük imkanlar sağlamaktadır (**Yusnita ve ark. 2005**).

2.4.1.7. Somaklonal Varyasyonun Kökeni

Doku kültürlerindeki genetik çeşitliliğin ana bitki hücresindeki değişimlerden ve kültür sırasında karyotipteki değişimlerden kaynaklandığı belirtilmektedir. *İn vitro* kültürdeki çeşitliliğin meydana gelmesinde 3 farklı dönemde ortya çıkabileceği bilinmektedir (**George 1993**);

1. Kültürün uyarım dönemi
2. Kültürün gelişme dönemi
3. Bitkinin rejenerasyon dönemi

2.4.1.8. Somaklonal Varyasyonun Nedenleri

Somaklonal varyasyonlara neden olabilecek durumlar aşağıda sıralanmıştır (**Ramulu ve ark., 1986; Heszky ve Sımon-Kiss, 1992; Marchetti ve ark., 1976;**

Heinz ve Mee, 1971; Evans ve Sharp, 1986; Singh ve Harvey, 1975; Brossard, 1976; Pierik, 1987; Ahloovvalia, 1983; Ryan ve ark., 1987; Armstrong ve ark., 1983; De Klerk 1990; George 1993; Karp 1994);

-Hücre organizasyonunun etkisi
-Donör bitki orijinindeki değişimler
-Başlangıç materyali olarak kullanılan eksplant tipi
-DNA metilasyonu
-Nükleik asit öncüllerinin kaybı
-*İn vitro* hücre bölünmesindeki anormallikler
-Bitki büyüme düzenleyicilerin önemi
-Kültür ortamının bileşimi
-Kültür koşulları
-Stres
-Altkültür sayısı ve süresi

2.4.1.9. Somaklonal Varyasyonun Meydana Gelmesinden Sorumlu Mekanizmalar

Somaklonal varyasyona neden olan faktörler genel olarak iki grup altında toplanabilir;

-Kromozomlardaki Sayısal ve Yapısal Değişiklikler

Doku kültüründe poliploidi ve anoploidi gibi sayısal değişiklikler ile inversiyonlar, delesyonlar, translokasyonlar ve izokromozomlar gibi yapısal değişiklikler sık sık meydana gelmektedir. Kromozomlar arasındaki parça değişimi yabancı gen alımı için uygun olabilmektedir (**Skirvin 1978; Larkin ve ark. 1989**). Kromozomlardaki sayısal veya yapısal değişiklikler mısır, yulaf (**McCoy ve ark. 1979**), yonca (**Reisch ve Bingham 1981**), çok yıllık çim (**Ahloowaha 1983**), triticale (**Lapitan ve ark. 1984**), buğday (**Karp ve Maddock 1984; Ahloowalia ve Sherington 1985; Davies ve ark. 1986; Chen ve ark. 1987**) ve patates (**Ramulu ve ark. 1986**) bitkilerinde tespit edilmiştir. Somaklonal varyasyonların meydana gelmesinden sorumlu olan kromozomlardaki sayısal varyasyonlardan en yaygın görüleni poliploididir (**Skirvin 1978**). Poliploidler endopoliploidiye (hücre bölünmesi olmaksızın kromozom sayısının katlanması) bağlı olarak meydana gelmektedir (**Damiani ve ark. 1985**). Diğer

taraftan doku kültürü haploid (polihaploid) ve anoploid bitkilere de sebep olabilir. Nitekim *Agropyron repens* × *Bromus inermis* hibridlerinde kallusta haploidden triploide kadar değişen sayıda kromozomlara sahip hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir (**Hezsky ve ark. 1993**). Anoploidler genellikle monozomik (2n-l) veya trizomik (2n+l) şekilde ortaya çıkmaktadır. Kültürde rejenere edilmiş anoploid bitkilere yulaf (**McCoy ve ark. 1982**), çok yıllık çim (**Ahloowalia 1983**), buğday (**Karp ve Maddock 1984; Chen ve ark. 1987**) ve patates (**Ramulu ve ark. 1986**) örnek olarak verilebilir. *İn vitro* kültürde karşılaşılan diğer bir durum miksoploid bitkilerin oluşmasıdır. Örneğin, gazelboynuzu (*Lotus corniculatus* L.) bitkisi *in vitro*'da çoğaltıldığında embriyo gelişmesi süresince endopoliploidi yoluyla bazı hücreler poliploid duruma gelerek, diploid ve poliploid hücrelerin karışımından ibaret miksoploid bitkiler oluşmaktadır. Miksoploid bitkilerde diploid hücreler (%50-90) poliploidlerden daha yüksek oranda bulunmuştur. Çalışmada, anoploid bitkilere ise rastlanmadığı bildirilmektedir (**Damiani ve ark. 1985**).

-Gen Seviyesindeki Değişiklikler

Doku kültürü nokta mutasyonları olarak adlandırılan DNA'daki baz dizisinin artmasına ya da eksilmesine ve buna bağlı olarak spesifik gen ürünlerinin miktarının değişmesine sebep olabilir. Böylece bu değişiklik fenotipe yansıyarak varyasyona neden olabilmektedir. Nitekim patates (**Landsmann ve Uhrig 1985**), buğday (**Breiman ve ark. 1987a**) ve yabani arpada (**Breiman ve ark. 1987b**) baz dizisinin azaldığı; havuç (**Nafziger ve ark. 1984)** ve triticalede (**Lapitan ve ark. 1988**) ise arttığı gözlenmiştir. Yine, mısır bitkisinde alkoldehidrogenase 1 lokusunda tek baz değişikliğinin gerçekleştiği kaydedilmiştir (**Dennis ve ark. 1987**). Doku kültüründe çoklugen kümelerinin fenotipe yansımasında da varyasyonlar meydana gelmektedir. Buna, buğdayda 1 ve 6 nolu kromozomlar üzerinde bulunan ve gliadin depo proteinlerini kodlayan genler (**Larkin ve ark. 1984; Cooper ve ark. 1986**) ile yabani arpanın hordeinlerinden sorumlu genler (**Breiman ve ark. 1987b**) örnek olarak verilebilir. Bu mutantlar ebeveynlerinde bulunmayan proteinleri önemli düzeyde oluşturmaktadır.

Somaklonal varyasyonun meydana gelmesinden sorumlu diğer bir mekanizma taşınabilir DNA'nın hareketidir (**Larkin ve ark. 1989**). Taşınabilir DNA (gezici gen) yeni genlerin düzenlenmesine, gen fonksiyonundaki baskılanması ya da uyarılmasına, translokasyonlar ve inversiyonlar gibi DNA'daki yeniden şekillenmelere sebep

olmaktadır. Örneğin, bir gliadin protein bandındaki varyasyonun asıl nedeninin, gendeki düzenleyici sıralara mobil bir elementin (DNA'nın) yerleşmesiyle oluşan gliadin geninin regülasyonundaki değişiklikten kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (**Larkin ve ark. 1984**).

2.4.1.10. Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Somaklonal varyasyon; **fenotipik, sitolojik** ve **moleküler düzeyde** incelemeler ile tespit edilebilir. Bu tez çalışmasında *Pistacia* klonlarının genetik kararlılıklarının belirlenmesi için moleküler belirteçler kullanıldığından, genel olarak bu belirteçler üzerine odaklanılmıştır.

2.4.1.11. Somaklonal Varyasyonların Moleküler Düzeyde Tespitinde Kullanılan Moleküler Belirteçler

Genetik belirteçlerin kullanılması yeni olmayan bir kavramdır ve George Mendel tarafından 19. yüzyılda yapılan fenotipik çalışmalar kapsamında da kullanılmıştır. Daha sonra *Drosophila* için fenotipe dayalı genetik belirteçler genetik bağlantının teorisinin kurulmasına yol açmıştır. Fenotipe dayalı genetik belirteçlerin sınırlamaları moleküler belirteçler olarak bilinen daha etkili DNA'ya dayalı belirteçlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bir moleküler belirteç genom düzeyinde farklılıkların temsili olan DNA'nın belirli bir bölümü olarak tanımlanır. Moleküler belirteç bir protein, bir gen, bir gen parçası veya gen olmayan bölgede bir dizi olabilir (**Yıldız ve ark. 2013**). Moleküler belirteçler spesifik bir özelliğin fenotipte ifade edilebilmesiyle de ortaya çıkabilir. İdeal bir moleküler belirteç tekniği aşağıdaki kriterlere sahip olmalıdır;

- Genom boyunca polimorfik ve eşit olarak dağılabilir olmalı
- Genetik farklılıkların yeterli kararlılığını sağlamalı
- Birden fazla bağımsız ve güvenilir belirteç oluşturmalı
- Basit, hızlı ve ucuz olmalı
- DNA örnekleri ve dokunun küçük bir miktarına ihtiyaç duymalı
- Farklı fenotiplerle ilişkili olmalı
- Bir organizmanın genomu hakkında daha önceden bir bilgi gerektirmemelidir.

Bitki ıslahında ve genetikte kullanılan genetik belirteçler iki kategoride sınıflandırılabilir: a) Geleneksel belirteçler, b) DNA/moleküler belirteçler **(Xu 2010)**. Geleneksel belirteçler, morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal belirteçleri içerir. DNA belirteçleri RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP gibi farklı tekniklere (southern-blotting-nükleer asit hibridizasyon, PCR-polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizi analizi) (**Collard ve ark. 2005**) dayalı birçok sistemi içerir.

-DNA/Moleküler Belirteçler

Moleküler belirteçler uygun bir yöntem aracılığıyla, tüm genom içinde tespit edilebilir özel DNA parçalarıdır. Bugüne kadar RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA; **Harding ve Benson 2000**), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm; **Turner ve ark. 2001**), SSR (Basit Dizi Tekrarları; **Harding ve Benson 2001**), ISSR (Basit Ara Dizi Tekrarları; **Zietkiewicz ve ark. 1994**), gibi moleküler belirteçleri farklı amaçlar için kullanılmıştır. Fizyolojik, epigenetik ve genetik düzeyde ortaya çıkan varyasyonlardan bazıları *in vitro* bitki hücre, doku ve organların kültürü ile ilişkilidir. Yani, organogenik potansiyelin olup olmamasına, vitrifikasyona, genotipe ve çevreye bağlı kompleks olaylara ve bitkide çoğaltım ve genetik manipulasyon ile bitki doku kültürünün pratik uygulamaları bu varyasyonları uyarabilir. Moleküler belirteçler ya ıslah programları için ya da pazar payı için *in vitro* teknolojinin başarılı kullanımını garantilemek adına; somakonal varyasyonları, mikroçoğaltılmış bitkilerin genetik çeşitliliğini doğrulamak ve *in vitro* kültür şartlarında istenilen genotipleri tespit etmek için bir gösterge olarak kullanır.

Moleküler belirteçler, bir DNA parçasının farklılıklarıyla temsil edilmekte olup, bunlar eklenme, silinme, yer değiştirme ve katlanma gibi değişikliklerle kendini gösterebilir. DNA'ya dayalı moleküler belirteçler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği gibi faklı bilim dallarında çok etkin bir şekilde kullanılan belirteçlerdir (**Schlotterer 2004**). Polimer zincir reaksiyonunun (PCR) keşfiyle DNA belirteçleri yardımıyla; gen etiketlemesi, genetik haritalama, tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler, belirteçler ile seçim (MAS) gibi önceden çalışılması zor olan birçok analiz kolaylaştırılmıştır (**Joshi ve ark. 2000**). Moleküler belirteçlerin avantajlarından bazıları aşağıda sıralanmıştır;

1) Çevre koşullarından etkilenmezler.

2) Kloroplast ve mitokondri gibi organellerdeki genomlar birbirinden bağımsız çalışılabilir.

3) Genetik olarak değişiklikleri daha fazla yansıtabildiklerinden daha az pleiotrofiktir (bir gen tarafından birde fazla sayıda özelliğin kontrolü).

4) Farklı karakterlerin teşhisi yapılabildiğinden bitkinin genetik orijini tespit edilebilir.

5) Sayısız miktarda moleküler belirteç oluşturulabilir.

6) Yüksek polimorfizim seviyesine sahiptir.

7) Tüm genom boyunca yayılabilir.

8) Şeffaf farklı allelik özellikleri vardır.

9) Fenotip üzerinde hiçbir zararlı etkisi yoktur.

2.4.1.13. Temel Moleküler Belirteç Tekniği

Temel moleküler belirteç tekniği iki ana kategoride sınıflandırılabilir:

-PCR temelli olmayan teknikler diğer bir adıyla hibridizasyon; (RFLP)

-PCR temelli teknikler; SSR (basit dizi tekrarları), RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), AFLP (çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm), ISSR (basit ara dizi tekrarları) ve SRAP (sequence related amplified polymorphism) gibi tekniklerdir.

Bu tez çalışmasında kullanılan ve genellikle en yaygın olarak çalışılmış tekniklerinden ISSR ve IRAP analiz tekniği üzerinde durulmuştur.

-ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)

Bitişik SSR dizileri arasındaki DNA dizilerindeki polimorfizmi ifade eden belirteçlerdir (**Godwin ve ark. 1997; Nagaoka ve Ogihara 1997**). ISSR belirteçleri genomda 100-3000 baz çifti arasında mikrosatellit bölgelerine yerleşmiştir. **Zietkiewicz ve ark.** (**1994**) tarafından keşfedilen ISSR tekniği; basit dizi tekrarlarına (mikrosatellit, SSR) göre tasarlanan primerlerle, komşu SSR bölgeleri arasındaki bölgenin PCR ile amplifikasyonuna dayanır (**Zietkiewicz ve ark. 1994**).

ISSR yöntemi, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan

ancak RAPD yöntemine göre çok daha hassas bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (**Zietkiewicz ve ark. 1994; Gupta ve ark. 1994**).

ISSR belirteçlerinin kullanımı hızlı, uygulanması kolay ve primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlikleri fazladır (**Bornet ve Branchard 2001**). Yeterli bilgi sunan ISSR primerlerinin kullanımı düşük bir maliyet, zamandan tasarruf ve genetik analizlerde kolaylık sağlamaktadır. ISSR belirteçleri, Mendel kalıtımına uygun olarak dominant belirteçler vermektedir (**Wang ve ark. 1998**). Bununla beraber kimi durumlarda homozigot ve heterozigotluğun tanımlanmasında kodominant (heterozigotu homozigot karakterden ayırabilen) belirteç de vermektedirler. RAPD belirteçlerinin düşük üretkenliği, AFLP belirteçlerinin yüksek maliyeti ve primer sentezlenebilmesi için dizi bilgisinin gerektiği SSR belirteçleri, birçok çalışmada önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. ISSR belirteçleri bu kısıtlamaların birçoğunun üstesinden gelir (**Zietkiewicz ve ark. 1994**).

Yüksek polimorfizm ve üretkenlik göstermesinden dolayı genetik benzerlik oranı, sınıflandırma ve gen haritalamalarında kullanımı elverişlidir (**Gupta ve ark. 1994; Zietkiewicz ve ark. 1994**). Ayrıca, filogenetik çalışmalarda, genom haritalarında, evrim biyolojisinde, birçok bitki türüne uygulanabilen etkili bir yöntemdir (**Reddy ve ark. 2002**). ISSR belirtecinin dezavantajlarından birisi tekrarlanabilirlilik oranının düşük olmasıdır (**Kesawat ve Das 2009**). Bununla birlikte, görece basitliği, nispeten ucuz olması ve çok az miktarda materyale ihtiyaç duyması bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin; buğday (**Nagaoka ve Ogihara 1997**), çeltik (**Blair ve ark. 1999**), arpa (**Fernandez ve ark. 2002**), mısır (**Kantety ve ark. 1995**), nohut (**Iruela ve ark. 2002**), çavdar (**Matos ve ark. 2001**), patates (**Prevost ve Wilkinson 1999; Mcgregor ve ark. 2000**), pirinç (**Navinder ve ark. 2004**), papaya (**Parasnis ve ark. 1999**), elma (**Goulão, Lu'1s ve Oliveira C.M. 2001**), zeytin ağacı (**Terzopoulus ve ark. 2005**), kahve (**Paulo ve ark. 2003**) gibi bitkilerde ISSR tekniğinin kullanılmıştır.

-Retrotranspozon Temelli Moleküler Belirteçler (IRAP ve REMAP)

Transpozon elementler ökaryotik genomlarda kendilerini bir konumdan başka bir konuma aktarabilme özelliğine sahip olan oldukça yaygın bulunan elementlerdir. Transpozon elementler yer değiştirme mekanizmalarına dayalı olarak iki sınıfa ayrılabilir: DNA transpozonları ve RNA transpozonları **(Finnegan 1989).** RNA

transpozonları retrotranspozonlar olarak bilinirler. Retrotranspozonlar öncelikle RNA ara formu olarak transkribe edilir daha sonra ters transkripsiyon ile DNA ara formuna dönüşür.

Retrotranspozonlar transkripsiyon ve entegresyon seviyelerinde aktivite gösteren bitki genomlarının en yaygın bileşenidirler. Bol bulunuşları, yer değiştirebilme özelliği ve genomun bütün kısımlarına yayılmış durumda olması gibi özelliklerinden dolayı somaklonal varyasyon çalışmalarında kullanılacak avantajlı genetik elementlerdir **(Voytas ve ark. 1992; Kumar ve Bennetzen 1999).** Büyük genoma sahip bitkilerde retrotranspozonlar tüm genomun %40-60'nı oluşturan tekrarlı DNA dizilerinin başlıca sınıfını oluştururlar (**Kumar ve Bennetzen 1999**). Retrotranspozonlar: LTR bölgesi (Uzun Uç Tekrarları) içeren, LTR bölgesi içermeyen, LINE (uzun ara nükleer elementler) ve SINE (kısa ara nükleer elementler) olmak üzere basit bir şekilde dört gruba ayrılabilir. LTR içeren retrotranspozonlar gypsy ve copia like retrotranspozonlar olarak da bilinirler **(Boeke ve Corces 1989; Doolittle ve ark. 1989).** Gypsy-like (**Suoniemi ve ark. 1998**) ve copia-like (**Voytas ve ark. 1992; Kumar ve ark. 1996**) retrotranspozonları bitkiler alemi boyunca hep var olmuşlardır. Retrotranspozonlar uzun, korunmuş ve tanımlanmış baz dizilerine sahip olmalarından dolayı moleküler belirteç sisteminin gelişmesine katkı sağlarlar (**Kalendar ve ark. 1999**).

Son yıllarda bitkilerde retrotranspozona dayalı moleküler belirteç sistemleri geliştirilmiştir (**Kumar ve Hirochika 2001; Schulman ve ark. 2004**). Bu belirteç sistemleri arasında: IRAP (Retrotranspozon arası çoğaltım polimorfizm; **Kalendar ve ark. 1999**); REMAP (Retrotranspozon-mikrosatallit çoğaltım polimorfizm; **Kalendar ve ark. 1999**), RBIP (Retrotranspozona dayalı ekleme polimorfizm; **Flavell ve ark. 1998**), SSAP (Spesifik dizi çoğaltım polimorfizm; **Flavell ve ark. 1998**) gibi moleküler belirteç sistemleri bulunmaktadır.

REMAP ve IRAP genom haritalamalarında (**Manninen ve ark. 2000**) ve allopoliploid türlerin genomik kararlılık çalışmalarında (**Baumel ve ark. 2002**) başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu iki belirteç sistemi vejetatif olarak çoğaltılmış türlerin genetik çeşitlilik çalışmalarının yanı sıra (**Breto ve ark. 2001; Natali ve ark. 2007**), bitki grubunun bir sınıfından türüne kadar olan ayrımlamayı da yapabilir (**Kalendar ve ark. 1999**).

IRAP ve REMAP genom içerisinde LTR'leri veren bölgelere bağlı geliştirilmiş amplifikasyona dayalı 2 belirteç metodudur (**Kalender ve ark. 1991**). Retrotranspozonlar, genomik DNA ve onların korunmuş uçları arasında yeni birleşme bağlantıları oluşturduğundan dolayı belirteç olarak kullanılabilir. Retrotranspozon eklemelerinde polimorfizmi tespit etmek için, belirteç sistemleri genellikle bu korunmuş uçlar ve yanındaki genomik DNA'nın bazı bileşenleri arasındaki PCR amplifikasyonuna dayanır. REMAP ve IRAP belirteç sisteminde belirteç bantları üretmek için restriksiyon enzimi gerektirmez. IRAP belirteç sistemi ürünleri dışarıya bakan primerler kullanılarak iki yakın retrotranspozondan üretilmiştir. REMAP belirteç sistemi ise, basit dizi tekrarlarına (mikrosatellit) yakın olan retrotranspozonlar arasını çoğaltan belirteç bantlarını üretir (**Kalender ve Schulman 2006**)

Retrotranspozonlar genom içinde her iki yönde de uyum sağlayabilirler. Kafa kafaya ya da kuyruk kuyruğa (head to head ve tail to tail) yönlerinde PCR ürünleri birbirine yeterince yakın elementlerden bir tek primer kullanarak üretilebilirler. Baştan kuyruk yönünde araya giren genomik DNA elementleri için hem 5′ hem de 3′ LTR primeri kullanılarak güçlendirilmiştir. REMAP yöntemi dışa bakan bir LTR primerine ve mikrosatallitten gelen ikinci bir primere bağlıdır. Primerler (GA)/, (CT)/, (CA)/, (CAC)/, (GTG)/ ve (CAC)/ mikrosatellitlere tasarlanmıştır ve primerler biri hariç hepsi 3′sonuna seçici bir baz ilave ederek 3′ ucu mikrosatellite bağlanmıştır. Her iki teknik de polimorfizm PCR ürünlerinin varlığında ya da yokluğunda tespit edilebilmiştir. Tek bir PCR reaksiyonunu takip ederek yaklaşık 30 bant gösterilebilir. Bu belirteçler aşırı derecede polimorfiktirler ve tür içi akrabalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. **Nair ve ark**. (**2005**), IRAP'ı muz çeşitlerinin sınıflandırılmasında kullanılmıştır. IRAP ve REMAP 51 pirinç cinsi arasındaki benzerlikleri belirlemede kullanılmıştır (**Branco ve ark. 2007**). IRAP tekniği 2 retrotranspozon arasında DNA'nın segmentlerini tamamlayarak ekleme polimorfizmi gösterir. Bu özelliği ile çok sayıda genetik çeşitlilik çalışmasında kullanılmıştır (**Antonius-Klemola ve ark. 2006; Kalender ve Schulman 2006; Smykal ve ark. 2008; Vukich ve ark. 2009**). **Pmykal ve ark.** (**2011**), tarafından yapılan bir çalışmada, keten bitkisinde retrotranspozon segmentinin ilk büyük setinin izole edilmesi ve genetik çeşitlilik ve germplazma yapısını değerlendirmek için 700'den fazla katılımla uygulama yapıldığı bildirilmektedir. Böylece IRAP'a bağlı keten gen kaynakları parmak izi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

2.5. *Pistacia* Türlerinde Yapılan Genetik Çeşitlilik ve Genetik Kararlılığın Belirlenmesi Çalışmaları

RAPD tekniğinin pratikte kullanılması '*Pistacia'* türlerinde **Hormaza ve ark.** (**1994a**) ve **Kafkas ve ark.** (**2001**) tarafından, bitki cinsiyetini erken dönemde belirleyebilmek için RAPD belirteçleri taranmış ve *P. vera*, *P. eurycarpa* ile *P. atlantica* türlerinde cinsiyetle ilişkili RAPD belirteçleri üretilmiştir.

Kafkas ve Perl-Treves (**2001; 2002),** tarafından yapılan diğer bir çalışmada, morfolojik verileri ve RAPD analizlerini kullanılarak Türkiye'deki yabani *Pistacia* genotiplerinin genetik çeşitliliği ve taksonomik ilişkilerinini incelendiği bildirilmiştir.

Zaloğlu ve ark. (**2009**), tarafından**,** "Siirt" çeşidi DNA'sını kullanarak 4 farklı motif ile zenginleştirilmiş genomik kütüphaneler oluşturulmuş ve *P. vera* başta olmak üzere diğer *Pistacia* türleri için de kullanılabilecek SSR primerleri geliştirilmiştir.

Ahmad ve ark. (**2003**), tarafından yapılan benzer bir çalışmada, antepfıstığında SSR primeri geliştirmek için "Kerman" çeşidinin DNA'sı kullanılarak genomik kütüphane oluşturulmuş ve geliştirilen 14 primer antepfıstığı çeşitlerinde de test edildiği bildirilmiştir.

Kafkas ve ark. (**2006**), antepfıstığı gen DNA polimorfizminin ve genetik akrabalığın belirlenmesi çalışmalarında 20 ISSR primeri kullanmışlardır.

Vezvaei (**1995**), İran antepfıstığı çeşitlerinde beş farklı izoenzim sistemini test etmiş ve en yüksek polimorfizmin AAT (aspartate amino transferase) ile GPI (glucose-6-phosphate isomerase) izoenzim sistemlerinden elde edildiği bildirilmiştir.

Dollo (**1996**), yaptığı çalışmada, İtalya'da yetişen antepfıstığı çeşitleri ve diğer *Pistacia* türlerinin tanımlanabilmesi için izoenzim analizleri kullanılarak GPI ile AAT izoenzim sistemlerinin en polimorfik sistemler olduğu belirlenmiştir.

Barone ve ark. (**1996**), İtalya'nın dişi ve erkek antepfıstığı çeşitlerinin tanımlanmasında izoenzim yöntemini kullanmışlardır ve dişilerin erkeklere oranla daha az polimorfik olduklarını belirlemişlerdir. Araştırıcılar üç farklı izoenzim sistemi kullanarak tüm erkek çeşitleri birbirinden ayırt edilebilirken, dişi çeşitlerin ancak %50'sini ayırt edebilmişlerdir.

Dollo ve ark. (**1995**), 15 farklı antepfıstığı çeşidinde RAPD tekniği ile 33 primer kullanarak DNA parmak izlerini çıkartmışlardır. Test edilen 33 primerden 14 tanesinin, tekrarlanabilir 37 adet polimorfik bant ürettiği belirlenmiştir. **Hormaza ve ark.** (**1994b**) bu 37 belirteçi kullanarak 15 antepfıstığı çeşidine ait dendogramları çıkartmışlardır. Elde edilen bulgulara göre iki grup oluşmuş; bunlardan birincisi Akdeniz, Kuzey Afrika ve Ortadoğu ülkeleri orijinli çeşitleri (Ask, Red Aleppo, Aegina, Bronte, Trobenalla, Nazareth, Sfax) bulundururken, ikinci grup ise İran-Hazar Denizi orijinli çeşitlerini (Peters, Gazvin, 02-16, 02-18, İran large, Damghan, Rashti, Kerman) bulundurduğu bildirilmiştir. **Hormaza ve ark.** (**1998**), yaptıkları bu çalışmayla Türk Cumhuriyetleri orijinli 16 adet daha genotip ekleyerek yukarıda sözü edilen hipotezin doğruluğunu test etmişler ve yine öncekiler ile benzer sonuçları elde etmişlerdir.

Parfitt ve Badenes (**1997**), *Pistacia* cinsi içindeki sınıflandırmanın yaprak morfolojisi ve jeografik dağılıma dayalı olarak yapılmasının yanında, moleküler genetik tekniklerinin 10 *Pistacia* türünün filogenetik ilişkilerini belirleyebilmek için yeni bir temel oluşturduğunu belirtmişlerdir. Yapılan analizlere göre, *Pistacia* cinsini iki ana gruba ayırmışlardır. Buna göre antepfıstığının en az yayılan tür olduğu ve Asya türlerinden biri olan *P. weinmannifolia*'nın *P. texana* ve *P. mexicana* türleriyle yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Hormaza ve ark. (**1998**), RAPD belirteçlerini kullanarak 29 antepfıstığı çeşidi ve tipleri arasındaki genetik çeşitliliği çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre yabani antepfıstığı çeşitleri içinde yüksek derecede polimorfizm olduğunu saptamışlardır. Araştırıcılar, koleksiyon parselinde farklı olarak tanımlanan materyalin aynı klon olduğunu ve aynı orijin bölgesinden geldiğini tespit etmişlerdir. Böylece, klonal çoğaltılan türler için genetik kaynaklar koleksiyonunun korunması ve tanımlanmasında moleküler belirteç tekniklerinin önemi vurgulanmıştır.

Kafkas ve ark. (**2000**), yaptıkları çalışmalarda *Pistacia* türlerinin iki evcikli (dioik) bitkiler olduklarını ancak, atlantik sakızının yabani populasyonu içinde monoik özellik gösteren bitkilerin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Araştırıcılar, Manisa'da Yunt dağında buldukları birkaç monoik atlantik sakızı ağacının erkek ve dişi çiçek olgunluk zamanlarını 2 yıl boyunca gözlemlemişler ve ağaçlar arasında farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. Ağacın birinde (PA-18 genotipi) tüm dallardaki çiçekler tamamen monoik

özellikte olmuş iken üç ağacın (PA-6, PA-13, PA-14) birkaç dalında sadece erkek çiçek salkımları bulunmuş, diğer dallarında ise sadece dişi çiçekler açmıştır. Diğer beş ağacın (PA-2, PA-8, PA-9, PA-17, PA-19) birkaç dalı üzerinde erkek çiçek salkımları dişi çiçek salkımları ile birlikte görülmüştür. Araştırıcılar, TTC (triphenyl tetrazolium chloride) testi ile monoik bitkilerde çiçeklerin polen canlılığını ve *'in vitro'*da çimlenme yeteneğini test etmişlerdir. Polen canlılığının %64-93 ve polen çimlenme oranının %34-64 arasında değiştiğini ortaya koymuşlardır. Analiz edilen bu değerler*, P. atlantica'*nın normal erkek ağaçlara benzer bulunmuştur. Araştırıcılar yaptıkları çalışma sonucunda, monoik özellik gösteren ağaçlardan elde ettikleri polenleri, 'Ohadi' ve 'Vahidi' antepfıstığı çeşitlerini tozlamak için kullanmış ve çimlenebilen tohumlar elde etmişlerdir.

Kafkas ve Perl-Treves (**2001**), morfolojik özellik verileri ve RAPD analizleri kullanılarak Türkiye florasındaki yabani *Pistacia* genotiplerinin genetik çeşitliliği ve taksonomik ilişkilerini araştırdıkları bir çalışmada; *P. vera, P. atlantica, P. terebinthus* ve *P. eurycarpa* türlerini kullanılmışlardır. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplam 40 yabani *Pistacia* genotipini karakterize etmişlerdir. Siirt ve Gaziantep illerinden 10 *P. eurycarpa* genotipi, Adana, Aydın ve Manisa illerinden 20 *P. atlantica* ve 10 *P. terebinthus* genotiplerini çeşitlerini ve *P. vera'* nın "Kırmızı" ve "Siirt" çeşitlerine de karşılaştırma için denemede yer verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, *P. vera'*ya en yakın türü *P. eurycarpa, P. atlantica* ve *P. terebinthus* olduğu tespit edilmiş, toplam 138 band veren 10 polimorfik RAPD primer, bu genotiplerin DNA parmak izlerini belirlemek için kullanılmışlardır. Analiz sonucunda, 4 *Pistacia* türü birbirinden açıkça ayrılmıştır. *P. terebinthus*'un *P. vera*'ya en uzak tür olduğu ve *P. atlantica* ve *P. eurycarpa'* nın en yakın iki tür olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada birkaç yabani genotipin türler arası melez olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Böylece bu dört türün her biri için türe özel belirteçleri belirlenmiş olup, gelecekte yeni genetik kaynakların sınıflandırılmasında yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Kafkas ve Perl-Treves (**2002**), RAPD analizi ile *Pistacia* cinsinin 9 türü arasındaki genetik ilişkileri araştırmışlardır. Çalışmada *P. atlantica, P. terebinthus, P. eurycarpa, P. vera, P. integerrima, P. mexicana, P. palaestina, P. lentiscus ve P. khinjuk* türlerine yer verilmiştir. Araştırıcılar 20 RAPD primeri kullanarak elde ettikleri toplam 242 bandın 228'inin türlerarası seviyede polimorfik olduğunu kaydetmişlerdir.

Araştırıcılar, primer başına düşen toplam bant sayısını 12.1 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını ise 11.4 olarak tespit etmişlerdir. Analiz sonucunda, iki ana grup oluşturmuşlardır. Birinci grup, tek gövdeli, büyük ağaçlara sahip olan *P. vera, P. khinjuk, P. eurycarpa, P. atlantica* ve *P. integerrima* türlerini içermiş olup; diğer grupta yeralan çalı formunda, küçük ağaçlara sahip türlerin ise *P. terebinthus, P. palaestina, P. mexicana* ve *P. lentiscus* olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada *P. palaestina* ve *P. terebinthus, P. eurycarpa* ve *P. atlantica, P. vera* ve *P. khinjuk, P. mexicana* ve *P. lentiscus*'un en yakın tür çiftleri olduğunu belirlemişlerdir. *P. terebinthus* ile *P. palaestina* türlerinin ise birbirlerine çok yakın akraba olduklarını bildirmiş ve *P. integerrima*'yı ise bu iki gruba dahil etmemişlerdir. Aynı zamanda, *P. eurycarpa*'nın (syn. *P. atlantica* var. *kurdica*) *P. atlantica*'dan farklı bir tür olduğunu belirtmişlerdir.

Kafkas ve ark. (**2002**), tarafından Türkiye'deki yabani *Pistacia* türlerine (*P. terebinthus* L., *P. atlantica* Desf. ve *P. eurycarpa* Yalt.) ait farklı bölgelerden toplam 65 *Pistacia* genotipi fenotipik ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Siirt ve Gaziantep illerinden 10 *P. eurycarpa* genotipi, Adana, Aydın ve Manisa illerinden 45 *P. atlantica* ve 10 *P. terebinthus* genotipleri karakterize edilmiştir. Çalışmada 10 kantitatif karakter ve 20 kalitatif karakter içeren toplam 30 karakter (4 ağaç, 19 yaprak ve 7 meyve) incelenmiş, hem tür içi hem de türler arası seviyede 65 genotip yüksek derecede çeşitlilik göstermiştir. Birkaç karakterin, tür seviyesinde tanımlayıcı karakter olduğu belirlenmiş olup meyve ağırlığının, meyve çapı ve yaprak uzunluğu ile pozitif ilişkili olduğu tespit edildiği bildirilmiştir.

Kafkas (**2003**), *Pistacia* cinsine ait türlerin dioik özelliklere sahip olduğunu bu durumun antepfıstığında verim ve kaliteyi olumsuz etkilediğini belirtmiştir. Araştırıcı, Manisa ili Yunt dağında buldukları monoik çiçek yapısına sahip atlantik sakızı genotiplerini kullanarak melezleme ıslahı programı başlatmıştır. Bu çalışmada, melezleme ile *Pistacia* içindeki kalıtımı ve cinsiyeti belirleyen mekanizmayı ortaya çıkarmak ve monoik antepfıstığı çeşitlerinin geliştirilmesini hedeflemiştir. Melezleme programında monoik atlantik sakızı genotiplerini, iki antepfıstığı çeşidini ("Siirt" ve "Uzun") ve Yunt dağındaki dioik atlantik sakızı ağaçlarını dişi ebeveyn olarak kullanmıştır. Ayrıca monoik atlantik sakızı genotiplerini, dioik erkek antepfıstığı ve atlantik sakızı ağaçlarını tozlayıcı ebeveyn bitkiler olarak kullanmıştır. Toplamda 20 farklı tür içi ve türlerarası melezleme gerçekleştirilmiş olup, bunlardan 4 kombinasyon

monoik *P. vera* populasyonlarını geliştirmek için kullanılırken, diğer kombinasyonlar *Pistacia* içindeki cinsiyet kalıtımını ve mekanizmasını belirlemek için yapılmıştır.

Katsiotis ve ark. (2003), *Pistacia* cinsinin (*Anacardiaceae*) yaprak karakterlerine ve meyve morfolojisine göre 4 grup olarak 11 tür içerdiğini, cpDNA (kloroplast DNA) kullanılarak 2 monofiletik grubun daha tespit edildiği (sakız ağacı gibi herdemyeşil, melengiç gibi yaprağını döken) bildirilmektedir. Yaptıkları çalışmada araştırıcılar, RAPD ve AFLP moleküler belirteç tekniklerini kullanarak, Yunanistan'daki *Pistacia* türlerinin doğal gelişimlerine dayalı olarak iki ana grup belirlemişlerdir. Araştırıcılar, bir gruba, herdem yeşil türler olan *P. lentiscus* ve reçine üreten *P. lentiscus* cv. Chia çeşidini; diğer gruba ise yaprağını döken *P. terebinthus, P. palaestine* ve *P. vera* türlerini dahil etmişlerdir. *P. chinensis'*i, ya RAPD verileri içeren herdem yeşil türlerle veya AFLP verileri içeren yaprağını döken türlerle gruplandırmışlardır. Çalışma sonucunda, *P. palaestina* türünün *P. terebinthus*'un bir alt türü olduğu bilgisine ulaşmışlardır.

Ahmad ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada antepfıstığında SSR primeri geliştirmek için 'Kerman' çeşidinin DNA'sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuş ve CA, CT ve CTT motiflerini kullanarak sekanslamaya hazır klonlar elde etmişlerdir. CT motifi ile zenginleştirilmiş kütüphaneden 89 klonun sekansı yapılmış ve %64'ü tekrarlanan motif içermiştir. CA motifi ile zenginleştirilmiş kütüphaneden ise 62 klonun sekansı yapılmış ve %59'u tekrarlanan dizilim içermiştir. Toplam 151 dinükleotit klondan %44'ünde primer dizaynı yapılabilmiştir. CTT ile zenginleştirilmiş kütüphaneden 33 klonun sekansı yapılmış ve %24'ünde primer dizaynı gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan primer çiftlerinden 25 tanesinin sentezi yaptırılmış ve primerler marketlerde bulunan değişik orijinli antepfıstığı çeşitlerinde Li-Cor sekanslama ünitesi kullanılarak test edilmiştir. 25 primer çiftinden 14 tanesi (%56) PCR sonucunda değerlendirebilir bant üretmiştir. 14 primer çifti toplam 46 allel üretmiş ve primer çifti başına düşen allel sayısı 2 ile 5 arasında değişmiştir. Bant büyüklükleri ise 120 ile 342 baz çifti arasında yer almıştır.

Barazani ve ark. (2003), Türkmenistan'da Kepele ve Agachli yörelerine ait iki ayrı populasyon tohumlarından elde edilen *Pistacia vera* L. çöğürlerinin büyüme güçleri ve genetik çeşitliliği değerlendirilmiştir. İki populasyon arasındaki farklılığı, hem bitki

büyüme oranı hem de RAPD analizleri ile belirlemişlerdir. Bununla birlikte, araştırmacılar bitkiler içinde uzunluğuna büyüme oranının, Agachli'nın 17 genotipinin, Kepele'nin 10 genotipine ait ortalamadan 1.3 kat ve gövde çapı büyüme oranının ise 1.2 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Avanzato ve Quarta (**2004**), Bulgaristan'ın Plovdiv bölgesine ait Rodopi dağlarında monoik çiçek yapısına sahip *P. terebinthus* ağaçları bulduklarını bildirmişlerdir. *P. terebinthus*'un monoik formlarının, 30-50 yaşlarında, kuru ve taşlı alanlarda büyüyen 2 - 3 m boyunda, koyu yeşil yapraklara sahip ağaçlar olduğunu belirtmişlerdir. Monoik ağaçlardan aldıkları vejetatif materyali, *P. integerrima* ve *P.terebinthus* anaçları üzerine aşılayarak dioik *P. terebinthus* ile karşılaştırmışlardır. Araştırıcılar, hem fenolojik gözlemler hem de moleküler analizler (RAPD) yaptıklarını ve monoik *P. vera* ıslah programı başlattıklarını bildirmişlerdir.

Golan-Goldhirsh ve ark. (**2004**), Akdeniz bölgesinin *Pistacia* türleri ve türler içindeki farklı tipler arasındaki polimorfizmi RAPD ve AFLP analizleri ile değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar, Akdeniz bölgesindeki farklı lokasyonlardan 6 türe ait 28 *Pistacia* tiplerini analiz etmişlerdir. 27 RAPD primeri kullanarak elde ettikleri toplam 259 DNA bandının 254'ünün polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, 15 AFLP primer çiftini analiz ederek kaydettikleri toplam 1026 bandın 954 (%93)'ünün polimorfik bant olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar çalışmalarında, benzerlik matriksi ile oluşturdukları dendogramların *Pistacia* türlerini iki gruba ayırdığını bunlardan birinci grup, bütün *P. lentiscus*'ları içermiş ve ikinci grup ise diğer bütün tipleri içermiş olup iki alt gruba ayrılmıştır. Bu alt gruplardan biri *P. palaestina* ve *P. terebinthus* türlerini ve diğer alt grup ise *P. atlantica*, *P. khinjuk* ve *P. vera* türlerinin içermiştir. Ayrıca araştırıcılar, *P. palaestina* ve *P. terebinthus* gibi, *P. vera* ve *P. khinjuk* türlerinin çok yüksek benzer olduğunu rapor etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (**2005**), *P. atlantica*, *P. integerrima* ve bu türlerin melezi olan farklı UCB-1 bitkilerinde SSR ve SRAP tekniklerini Li-Cor sistemini kullanarak uygulamışlardır. SSR tekniğinde 12 primer çifti uygulanmış ve lokus başına 2.9 bant düşmüştür. Primer başına düşen allel sayısı 2 ile 5 arasında değişmiştir. SRAP tekniğinde ise sekiz primer kombinasyonu uygulanmış ve primer çifti başına düşen bant sayısı 11 ile 38 arasında değişiklik göstermiş ve ortalama 25.2 olmuştur. Toplam 202

banttan %51'inin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Bant büyüklükleri ise 80 bç ile 720 bç arasında değişmiştir.

Yakubov ve ark. (**2005**), antepfıstığında cinsiyeti belirleyen belirteçleri geliştirmek için SCAR (squence characterized amplified regions) primer kombinasyonları ile Toucdown-PCR yöntemi kullanmışlardır. Cinsiyeti erken dönemde belirleyebilmek için uyguladıkları metodun basit ve güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir.

Kafkas (**2006**), 10 *Pistacia* türüne ait 31 yabani ve 4 kültür çeşidi olmak üzere toplam 35 genotip üzerinde AFLP tekniğini kullanarak filogenetik analiz yapmış ve 6 AFLP primer kombinasyonu ile 254'ü polimorfik olan (%92.4) toplam 275 bant elde etmiş, primer başına düşen toplam bant sayısını 45.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 41.5 olarak bulmuştur. Polimorfizm oranını %90.5 olarak hesaplanmıştır. Ayırma gücü değerlerinin 30.7 (EAGG/MATC) ile 54.0 (EAGC/MATC) aralığında değişmiş, ortalama ayırma gücü 40.43 ve toplam ayırma gücü (AG) 242.6 olarak hesaplanmıştır. Polimorfizm bilgi içeriği ortalamasının 0.668 olduğu bildirilmiştir.

Kafkas ve ark. (**2006b**), Türkiye'nin gen kaynaklarında bulunan 69 antepfıstığı çeşidini RAPD, ISSR ve AFLP yöntemlerini kullanarak tanımlamışlar ve aralarındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada toplam 572 belirteç elde edilmiş ve bunların 307 tanesi polimorfizm göstermiştir. Antepfıstığı çeşitleri esas olarak iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta İran orijinli çeşitler yer alırken, ikinci grupta "Siirt" grubu, Türk çeşitleri ve Suriye orijinli çeşitler ile Kuzey Afrika ve öteki Akdeniz ülkeleri orijinli çeşitler yer almıştır. İkinci grup esas olarak üç alt gruba ayrılmıştır: birinci alt grup "Siirt" çeşidi ve bu çeşit içerisinden selekte edilen genotipleri kapsamıştır. İkinci alt grup ise standart Gaziantep ile Şanlıurfa yöresi çeşitlerini ("Kırmızı" ve "Uzun") ve bu çeşitler içerisinden selekte edilmiş genotipleri içine almıştır. Üçüncü alt grupta ise Yunanistan, Tunus, İtalya ve Kıbrıs'da yetiştirilen çeşitler yer almıştır. Ülkemizde yetiştirilen "Halebi" çeşidi de bu alt gruba girmiştir. Genetik uzaklıklara bakıldığında "Siirt" çeşidinin İran grubu ile Akdeniz ülkeleri orijinli çeşitler arasında yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca araştırıcılar üç moleküler belirteç sistemini de polimorfizm vb. özellikler bakımından karşılaştırmış ve sonuçta en iyi yöntemin AFLP olduğu sonucuna varmışlardır. RAPD ile ISSR arasında polimorfizm ve bant sayısı bakımından farklılık

gözlenmemesine karşın tekrarlanabilirlik bakımından ISSR tekniğinin daha üstün olduğu belirlenmiştir.

Kafkas ve ark. (**2006a**), AFLP tekniğini kullanarak Afganistan'ın Kunduz ve Takhar bölgelerinden alınan 17 yabani antepfıstığı ve 3 kültür çeşidinin moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. 8 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak 136'sı polimorfik olan toplam 288 AFLP fragmenti elde etmişlerdir. Primer kombinasyonlarının 18–48 arasında değişen sayıda polimorfik bant ürettiğini ve primer başına düşen polimorfik bant sayısının ortalama 17 olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek polimorfizmi EACC/MGAG primer kombinasyonunun verdiğini, en düşük polimorfizmi ise EAAG/MCTA primer kombinasyonun verdiğini bulmuşlardır. Polimorfizm oranını %46.7 olarak hesaplamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre 17 yabani Afgan antepfıstığı çeşidini bölgelerine göre gruplandırmışlar ve 3 kültür formundan ayırmışlardır. AFLP tekniğinin yabani antepfıstığı karakterizasyonu için uygun bir teknik olduğunu bildirmişlerdir.

Basha ve ark. (**2007**), Suriye'de bulunan 37 üretici bahçesinden topladıkları 114 antepfıstığının morfolojik ve moleküler düzeyde analiz yapmışlardır. Moleküler analiz için 7 primer kombinasyonu kullanarak AFLP yöntemini uygulamışlardır. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısının 24 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, 25 dişi antepfıstığı çeşidi tespit etmişler ve bunlardan bazılarının ilk kez tespit edilen çeşitler olduğunu bildirmişlerdir. AFLP yönteminin genetik çeşitliliği belirlemede başarılı bir yöntem olduğunu ve morfolojik karakterlerle moleküler analiz sonuçlarının birbirleri ile tutarlı olduğunu açıklamışlardır.

Afzadi ve ark. (**2007**), İran'da yetişen bazı yabani *Pistacia* türleri ile bazı antepfıstığı çeşitlerinin genetik çeşitliliğini AFLP ile analiz etmişlerdir. Araştırıcılar, 45 antepfıstığı genotipini analiz etmek için AFLP primeri kullanmışlar ve ortalama polimorfizmi %95.2 olan toplam 506 polimorfik bant belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, antepfıstığı genotipleri 4 gruba ayrılmıştır. Ticari olarak yetiştirilen bütün antepfıstığı genotipleri grup I ve II içinde yer almıştır. Araştırıcılar çalışma sonucunda yabani antepfıstığı genotiplerinin kültürü yapılan çeşitlerden ayrıldığını ve AFLP tekniğinin antepfıstığının genetik çeşitliliğini analiz etmek için güvenilir bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

Albaladejo ve ark. (**2008**), Akdeniz ikliminde yetişen sakız ağacı için 8 polimorfik mikrosatellit belirteçleri geliştirmişlerdir. Çalışmada İspanya'nın güneyinde bulunan iki populasyondan 42 birey üzerinde 8 lokusun karakterizasyonu yapılmıştır. Araştırıcılar, her bir lokus için 3-13 arasında değişen tüm allel sayısını 59 olarak belirlemişlerdir. Her bir lokus ve populasyon için beklenen heterozigotluğun 0.139 ile 0.895 arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Karimi ve ark. (**2009**), AFLP belirteçlerini kullanarak farklı *Pistacia* türleri arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmalarında *P. vera, P. eurycarpa, P. khinjuk* türlerine ait toplam 44 genotip, *P. atlantica*'nın alt türleri (*atlantica, mutica, kurdica, cabulica*) ile üç melez bitkiye (*P. eurycarpa x P. atlantica*, subsp. *mutica* ve *cabulica*) ait materyalleri kullanmışlardır. Araştırıcılar, 6 adet AFLP primer kombinasyonundan elde ettikleri toplam 475 bandın 340'ının polimorfik ve primer çifti başına düşen ortalama bant sayısını ise 71.33 olarak bulmuşlardır. Araştırıcılar yapılan istatistik analiz sonucunda *P. vera*'ya en yakın türün *P. eurycarpa* ve bunu *P. atlantica* ve *P. mutica* türlerinin izlediğini belirtmişlerdir. Ayrıca *P. atlantica*'nın iki alt türü olan *P. atlantica* subsp. *mutica* ve *cabulica*'nın birbirlerine en yakın genotipler olmasına rağmen, bunların *P. atlantica*'dan ayrı olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, araştırıcılar çalışmalarında *P. atlantica* subsp. *mutica*'nın, *P. mutica*'dan ayrı bir tür olduğunu, *P. mutica* subsp. *cabulica*'nın ise *P. mutica*'nın bir alt türü olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Araştıcılar, elde ettikleri sonuçlara göre *P. eurycarpa*'nın, *P. atlantica*'dan farklı olarak, *P. atlantica* subsp. *kurdica*'nın sinonimi olduğu kanısına varmışlardır.

Pazouki ve ark. (**2009**), 22 yabancı *P. vera* çeşidi ile birlikte 282 yerel *Pistacia* genotiplerini 10 SSR belirteçi kullanarak *Pistacia* türleri ve çeşitleri arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Araştırıcılar elde ettikleri sonuçlara göre *P. atlantica* subsp. *kurdica* içindeki genetik çeşitliliğin *P. vera* ve *P. khinjuk*'dan daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar yaptıkları istatistik analizine (ANOVA) göre türler arasında, farklı populasyonlar arasında ve populasyonlar içindeki varyasyonun, toplam varyasyonun sırasıyla %41'i, %9'u ve %50'si olduğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar çalışma sonuçlarının, SSR belirteçlerinin kullanılarak *Pistacia* türleri ve çeşitleri arasındaki genetik ilişkilerin ve çeşitliliğin belirlenmesinin antepfıstığı genetik kaynaklarının korunması ve toplanması için önemli bilgiler sağladığını bildirmişlerdir.

Noroozi ve ark. (**2009**), İran'da zengin antepfıstığı kaynaklarının bulunduğunu, bu yüzden dünyada yerel antepfıstığı çeşitlerinin sayısı ve çeşitliliğinin çok fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar, 6 ISSR primerleri ile 31 çeşit arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmalarında GA, CA, GAA tekrarlara dayalı ISSR primerlerinden iyi bir amplifikasyon ürünü elde edilmiş, ancak CT, GT ve CAA tekrarlara dayalı primerler ise daha az verimli olmuştur. Araştırıcılar, üç primerden elde ettikleri toplam 28 bandın 13'ünün polimorfik olduğunu, ortalama bant sayısını ise 9.3 olarak bulmuşlardır. Toplam bant sayısı 7-12 arasında ve polimorfik bant sayısı ise 3 - 5 arasında değişiklik göstermiştir. Ayrıca, araştırıcılar, analiz ettikleri çeşitler arasında düşük genetik çeşitlilik görüldüğünü ve ISSR-PCR analizinin etkili bir polimorfizme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Shanjani ve ark. (**2009**), antepfıstığının genetik çeşitliliğinin bilinmesinin, bu türün korunması için uygun yönetim stratejilerinin oluşturulması için gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırıcılar, birkaç yabancı çeşitlerle birlikte, en önemli İran çeşitleri ve 3 yabani türden (*P. vera*, *P. khinjuk* ve *P. atlantica* subsp. *kurdica*) yedi populasyona ait toplam 216 antepfıstığı genotipleri içindeki AFLP polimorfizmini belirlemek için analiz etmişlerdir. İran çeşitleri içinde yüksek derecede genetik çeşitlilik belirlenmiş ve bunlar yabancı çeşitlerden belirgin şekilde ayrılmıştır. Araştırıcılar, sonuçları diğer türlerle karşılaştırıldığında, en düşük toplam bant sayısına sahip *P. atlantica* subsp. *kurdica* içinde en düşük polimorfizm gözlendiğini belirtmişlerdir. Bu duruma göre, doğal ortamda hızlı bir düşüş gösteren *P. atlantica* subsp. *kurdica*' nın güçlü bir genetik çeşitlilik kaybını açığa çıkardığı bildirilmiştir.

Koç ve ark. (2014), *in vitro* mikroçağaltılmış sakız ağacının (*P. lentiscus* L.) farklı süreler boyunca (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 ay) karanlıkda ve 4 _C'de 12 ay soğukta depolanmış ve soğuk depolama şartlarının ortaya çıkardığı genetik değişiklikler belirlenmiştir. AFLP ve IRAP belirteç sistemleri kullanılrak farklı depolama süreleri sonunda bitkilerin gösterdikleri genetik kararılıklar belirlenmiştir. Toplamda 10 AFLP primer çifti kullanılarak 720 bant üretilmiştir. Kontrol grubu ve soğukda depolanan klonlar arasında genetik benzerlik değeri 0.74 ortalama ile 0.66 ile 0.84 arasında değişmiştir. 8 IRAP primeri ile 159 bant oluşturulmuş ve kontrol grubu ile klonları arasında genetik benzerlik 0.72 ortalama ile 0.65 ile 0.83 arasında değişmiştir.

Akdemir ve ark. (2016), uzun dönem *in vitro* mikroçoğaltımı yapılmış olgun antepfıstıklarının apikal tomurcuklardan ve yapraklardan başlatılmış kültürlerden elde edilen sürgünlerin RAPD, AFLP ve ISSR belirteç sistemlerini kullanarak moleküler kararlılıklarını belirlenmiştir. Uzun süreli altkültürleme sonucunda, ana materyal ile karşılaştırıldığında *in vitro* üretilen bitkilerde makul düzeyde varyasyon oluştuğu belirlenmiştir.

Uzun ve ark. (2017), Orta Anadolu'da bulunan Kayeri yöresinden seçilmiş 50 ceviz genotipleri arasında genetik ilşkileri belirlemek amacıyla 20 SRAP moleküler belirteçleri ile yaptıkları çalışmada, 117 tanesi polimorfik olmak üzere toplamda 130 bant elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan ceviz genotipleri arasındaki genetik benzerlik oranları 0.62 - 0.93 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Genetik yakınlık olarak birbirine 0.93'lük benzerlik oranı ile en fazla benzeyen 49 ve 50 numaralı genotipler olmuştur. Islah çalışmaları acısından yüksek polimorfizm eldesi sonucunda bu çalışma büyük önem taşımaktadır.

Bu tez kapsamında, yukarıda özetlenen kaynaklar ışığında antepfıstığının ***P. vera* × *P. atlantica*, *P. vera* × *P. vera*, *P. vera* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* × *P. atlantica*, *P. khinjuk* × *P. terebinthus*** ve ***P. khinjuk* × *P. khinjuk*** melez genotipleri üzerine mikroçoğaltma prokolü optimize edilerek ve uzun dönem *in vitro* çoğaltılan klonların genetik kararlılıkları ISSR ve IRAP moleküler belirteçleri ile karekterize edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Melezleme Çalışmaları

Çalışmanın klasik melezlemede kullanılacak ebeveyn materyalini Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü bahçesinde bulunan *Pistacia* genusunun hem erkek hem de dişi genotipleri *P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. *ve P. atlantica* Defs. arasında kontrollü tozlaştırma ile tür içi ve türler arası melez tohum üretimi aşağıdaki gibi yapıldı:

3.1.1.1. Sürgünlerin İzolasyonu

İzolasyon için kese kâğıtları kullanıldı. Kese kağıtlarının kapatılma işlemi ise plastik yapıştırıcılarla yapıldı. Keseleme işlemi dişi ebeveynlerin çiçeklenme başlangıcına yakın zamanda yapıldı ve en az 3 çiçek gözü olan sürgünler kullanıldı. Her erkek ebeveyn için her dişi ebeveyn ağaçta en az 5 sürgün keselendi (Şekil 3.1.).



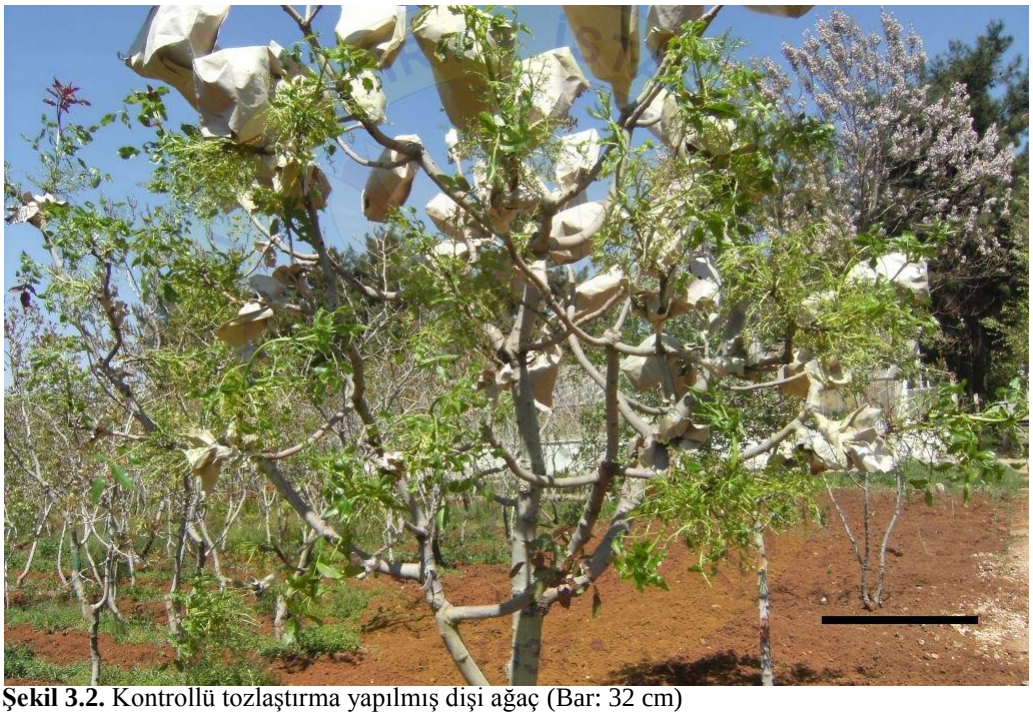
Şekil 3.1. Çiçeklenme başlangıcına yakın çiçek gözü keselenmiş dişi ebeveyn

3.1.1.2. Çiçek Tozu Eldesi ve Muhafazası

Erkek ebeveynlerden çiçek tozu eldesi için erkek çiçek salkımlarının toplanmasına çiçeklenme başlangıcından sonra başlandı. Geç çiçeklenen erkek tiplerde keseleme yapılarak çiçeklenme erkene alındı. Toplanan çiçek salkımları kafes teli gerilmiş sandıklar üzerine serilerek laboratuvar koşullarında 1 gün içerisinde çiçek tozları alındı ve bunlar melezlemede kullanıldı. Daha sonra melezlemede kullanılan çiçek tozları ise buzdolabında, içinde $CaCI_2$ bulunan desikatörde muhafaza edildi.

3.1.1.3. Melezlemelerin Yapılması

Melezlemede kullanılacak çiçek tozları küçük penisilin şişelerine konulup, ağızları pamukla kapatıldı. Melezleme laboratuvar yakınındaki bahçede yapıldığında çiçek tozları desikatörde, uzakta ise aracın buzdolabında taşındı. Melezleme tam çiçeklenmeye yakın zamanda el pompası ile yapıldı. Kese kâğıtlarına küçük delikler açılıp, içerisine çiçek tozu konulan el pompası ile püskürtme yapılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Kontrollü tozlaştırma yapılmış dişi ağaç (Bar: 32 cm)



Şekil 3.3. Kontrollü tozlaştırılma sonrası çiçek tomurcuğu (Bar: 4.47 mm)

Her sürgünün üzerine etiketleri bağlandı. Dişi ağaçlarda çiçeklenme sona erdiğinde sürgünlerdeki kese kağıtları yırtılmak suretiyle çıkarıldı (Şekil 3.3.). Tohumlar yeterli olgunluğa ulaştığında toplanıp serin ve kuru ortamda kurutulup muhafaza edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kontrollü tozlaşma ile elde edilen melez tohumlar, **a)** *P. vera* × *P. atlantica* (Bar: 20 mm), **b)** *P. vera* × *P. terebinthus* (Bar: 16 mm), **c)** *P. vera* × *P. vera* (Bar: 10 mm), **d)** *P. khinjuk* × *P. khinjuk* (Bar: 13 mm), **e)** *P. vera* × *P. khinjuk* (Bar: 10 mm), **f)** *P. khinjuk* × *P. terebinthus* (Bar: 14 mm)

Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü uygulama bahçelerinde bulunan *Pistacia* cinsinin tescilli 4 farklı türünün (*P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. ve *P. atlantica* Defs.) hem erkek hem de dişi genotipleri arasında yapılan kontrollü tozlaşma ile tür içi ve türler arası melezlemeden elde ***P. khinjuk* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. atlantica***, ***P. vera* × *P. atlantica***, ***P. terebinthus* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. khinjuk***, ***P. vera* × *P. vera***, ***P. vera* × *P. terebinthus*** *ve* ***P. vera* × *P. khinjuk*** genotiplerinin tohumları kullanıldı. Dicle Üniversitesi, Ziraat

Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında 2013-2017 yılları arasında çalışmalar yürütülmüştür. Araştırmada eksplant kaynağı *in vitro* ortamda yapılan çimlendirme çalışmaları sonucunda gösterdikleri çimlenme özelliklerinden dolayı ve bölge koşullarına uygun olduğu düşünülen klonal anaç üretimine aday 3 genotip; ***P. vera* × *P. vera***, ***P. khinjuk* × *P. terebinthus*** ve ***P. khinjuk* × *P. atlantica*** seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kültür Besi Ortamı

3.2.1.1. Besi Ortamının İçeriği

Sürgünlerin proliferasyonuna kültür besi ortam tipinin etkisinin test edildiği deney haricindeki bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog **(Murashige Skoog 1962;** Standart MS besi ortamı) katı besi ortamı kullanıldı. Tüm çalışmalarda besi ortamını katılaştırmak için ortam 6.5 gl^{-1} agar (Sigma Ltd.) ile desteklendi.

3.2.1.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda MS besi ortamı modifiye edilerek kullanılmıştır. Tüm kültür çalışmalarında besi ortamı 6.5 gl^{-1} agar ile katılaştırılmıştır.

Çizelge 3.1. Temel MS besi ortamı içeriği

İçerik	Miktar
MS Ana Solüsyon (Makro elementler)	100 ml
MS mikroelementler-1	10 ml
MS mikroelementler-2	1 ml
Kompleks kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
myo-inositol	10 ml

Besi ortamı bileşenlerinin ve büyüme düzenleyicilerinin seçimi; türlerin kültüre başarılı bir şekilde alınması ve rejenerasyon sistemlerinin optimize edilmesi bakımından son derece önemli faktörlerdir. Kullanılan tüm maddeler mgl^{-1} ve/veya ağırlık/hacim (w/v) ile ifade edildi. Bir litrelik standart MS besi ortamı hazırlamak için 1 litrelik erlanmayer içerisine 500 ml steril saf su bırakıldı. Daha sonra belirtilen miktarda sukroz eklendi. Bu işlemi sırasıyla Çizelge 3.1.'de verilen ortam bileşenlerinin, belirtilen konsantrasyonlarda erlenmayer içine aktarılması izledi. Her maddenin ilave

edilmesinden sonra çökmeyi önlemek amacıyla, hazırlanan solüsyon birkaç dakika çalkalandı. Ortam için gerekli olan bu bileşenlerin eklenmesinden sonra, tüm bu karışım steril saf su ile l litreye tamamlandı. Daha sonra amaca göre; 250 ml ya da 500 ml'lik erlenmayerlere aktarıldı. Yapılacak deneyin amacına uygun olarak, bitki büyüme düzenleyicileri eklendikten sonra, pH 5.7-5.8'e ayarlandı (0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile). SH ve WPM besi ortamları için hazır besi ortamları kullanıldı. Ortamın katılaştırılması için agar eklendi. Hazırlanan besi ortamının sterilizasyonu; 1 atmosfer basınçta 121° C'de 25 dakika süre ile ya da besi ortamının miktarına göre bu süre azaltılarak ya da arttırılarak otoklavda bekletilmek suretiyle gerçekleştirildi. Sterilizasyonu yapılan besi ortamı, röpikaj odasında (transfer odası) steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kabı 40 - 50 ml olarak paylaştırıldı. Besi ortamı soğuyup katılaştıktan sonra deney kapsamında hazırlanan tohumların dikim işlemi yapıldı. Kapaklarının etrafı parafilm ile sarılan kültür kapları daha sonra büyüme odasına alındı.

3.2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) stok çözeltilerinin hazırlanması için, büyüme maddelerinin gerekli olan miktarları hassas terazi yardımıyla tartıldı. Stok çözeltilerin tümü genellikle mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Sonra 25, 50 veya 100 ml temiz balon jojeler içerisine tartımdan sonra konan büyüme maddeleri küçük bir magnetik karıştırıcı ile birlikte çözdürülmeye başlandı. Her madde az miktarlarda (5 - 10 ml) 1 M KOH, (TDZ ve NAA için), ya da (5-10 ml) HCl (BA, Kinetin, Zeatin, TDZ ve 2iP için) içinde çözdürüldü. Bazı maddeler ise (IBA, 2,4-D) alkolde eritildi. Eritilen BBD'ler steril saf suyla, 50 veya 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan stok çözeltiler Kinetin -20° C'de TDZ, BA, IAA, IBA, 2iP, 2,4-D ve NAA +4° C'de buzdolabında saklandı ve her üç haftada bir yeniden taze solüsyonlar hazırlandı.

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu Teknikleri

İn vitro doku kültürü çalışmalarında sadece önemli olan sterilizasyon işlemlerinde kullanılacak materyallerin kontaminasyonlardan arındırılmış olması değil, aynı zamanda sterilizasyon sırasında materyallerin biyolojik aktivitelerini kaybetmemeleridir. Bu yüzden kullanılacak sterilantın çeşidi ve yüzdesi son derece önemlidir. Çalışmalarda kullanılan melez *Pistacia* tohumların *in vitro* koşullarda

herhangi bir mantar veya bakteri kaynaklı enfeksiyonunu engellemek ve kontaminasyondan kaçınmak için, başlangıç materyallerinin yanı sıra; çalışmanın yapıldığı ortamın, besi ortamlarının, kullanılan alet ve kültür kaplarının tamamen steril şartlar altında hazırlanıp kullanılması son derece önemlidir. Bu nedenle sterilize edilecek materyaller için, en iyi yüzey sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir. Bununla birlikte, geliştirilen bu tekniğin, tüm bu mikroorganizmaları uzaklaştıracak, aynı zamanda kullanılan materyalin sistemine zarar vermeyecek uygun bir yöntem olması gerekmektedir.

Yapılan bütün *in vitro* çalışmalar sırasında izlenen sterilizasyon teknikleri aşağıda tanımlanmıştır.

3.2.2.1. Isı ile Sterilizasyon

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

1. Besi ortamı içeren otoklavlanabilen cam şişeler (500 ve/veya 1000 ml)
2. Magenta GA-7 doku kültür kapları

3.2.2.2. Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Doku kültürü işlemleri sırasında kullanılan pens ve bisturilerin sterilizasyonunu muhafaza etmek, üzerinde bitki parçalarının kesilmesi, tohumların kurutulması vs. amaçlarla kullanılmak üzere ile iki ayrı ebatta kesilen filtre kağıtları, iki kat parşömen kağıtlara sarılarak, etüvde 180° C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

3.2.2.3. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

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

3.2.2.4. Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pens ve bistüriler öncelikle %96'lık etil alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 180° C'lik bir kuru sterilizatörde 2 saat süre ile sterilize edildi.

3.2.2.5. Kullanılan Aseptik Yöntemler

Çalışmamızda gerçekleştirilen tüm işlemler standart sterilizasyon yöntemleri izlenerek steril bir oda içindeki laminer akımlı steril bir kabin içinde gerçekleştirildi. Çalışmada tek kullanımlık steril cerrahi Triflex eldivenleri kullanıldı. Doku kültürü çalışmaları sırasında düzenli olarak eller %96'lik alkol ile steril edildi. Çalışmaların tümünde yüz maskesi kullanıldı. Laminer akımlı steril kabin zemini ve yüzeyleri her defasında kullanımdan önce ve kullanım sırasında devamlı teknik alkolle silindi ve 20 d UV ışık altında bırakıldı.

3.2.2.6. Sterilizasyonun Korunumu

Yapılmış olan bütün sterilizasyon işlemlerinin sürdürülmesi için mümkün olan tüm önlemler alındı. Otoklavda sterilize edilen besi ortamları bulunan cam şişeler ve Magenta GA-7 doku kültür kapları steril odaya hızlı bir şekilde aktarıldı. Tezgah yüzeyi ve şişeler teknik alkol ile silinerek yerleştirildi.

3.2.3. Kültür Şartları

Yapılan çalışmaların amacına göre (tohum dikimi, köklenme, vs.) miktarda yapılan değişikliklerle beraber genel olarak eksplantlar için 40 - 50 ml katılaştırılmış besi ortamı içeren Magenta GA-7 kültür kapları kullanıldı.

3.2.3.1. Büyüme Odası Koşulları

Büyüme odasında 30 - 60 μm m^{-2} s^{-1} ışık şiddetine sahip cıvalı Flüoresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn), ortam sıcaklığını 25 ± 2° C de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi (klima ve termostat), 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak biçimde düzenlenmiş fotoperiyotlu ortamda kültürlerin gelişmesi için gerekli ortam hazırlandı.

3.2.3.2. Aklimatizasyon Şartları (Adaptasyon Odası)

Çalışmalar sonucunda elde edilen ve büyüme odasından çıkarılan köklü bitkilerin arazi koşullarına uyumunu sağlamak amacıyla kullanılan aklimatizasyon odasının bir cephesi tamamen cam olup, güneş ışığını olduğu gibi almaktadır. Ayrıca raflı bir tezgah sistemi bulunmakta ve bitkilerin gün ışığından daha iyi faydalanmaları

sağlanmaktadır. Sıcaklığın daha iyi kontrol altına alınabilmesi için bir klima da bulunmaktadır.

3.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneyler ana başlıklar halinde aşağıdaki gibi sıralanabilir;

a) Sterilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi

b) Kültür başlatma

c) Stok kültürlerin elde edilmesi

d) Sürgün proliferasyon

e) Köklendirme

f) Aklimatizasyon (adaptasyon)

g) Somaklonal varyasyonların belirlenmesi.

3.3.1. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Bu bölümde *Pistacia* cinsinin tescilli 4 farklı türünün (*P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. ve *P. atlantica* Defs.) hem erkek hem de dişi genotipleri arasında kontrollü tozlaştırma ile tür içi ve türler arası melezlemeden ortaya çıkan; ***P. khinjuk* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. atlantica***, ***P. vera* × *P. atlantica***, ***P. terebinthus* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. khinjuk***, ***P. vera* × *P. vera***, ***P. vera* × *P. terebinthus*** ve ***P. vera* × *P. khinjuk*** genotiplerine ait tohumlar kullanılmıştır. Araştırma kapsamındaki sterilizasyon çalışmalarında, %53 NaOCl ticari sterilant kullanılmıştır. Tüm sterilizasyon işlemleri röpikaj odasında yapılmış olup, çalışmalarda genellikle Magenta GA-7 kültür kapları kullanılmıştır. Standart MS besi ortamına 30 gl^{-1} sukroz ve 6.5 gl^{-1} agar ilave edilerek BBD'siz olarak hazırlanmıştır. Aşağıdaki bütün deneylerde yüzey sterilizasyon işlemleri elle yapılmıştır.

Tüm sterilizasyon 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 14. 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.

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.1.1. Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde kontrollü melezleme ile elde edilen melez *Pistacia* tohumlarının sterilizasyonu ve *in vitro* çimlenmesi üzerine NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Tohumlar endokarptan uzaklaştırmak için çekiçle kırıldı. Endokapları çıkarılan tohumlar 5 d steril saf suda yıkandı. Daha sonra NaOCl'nin %5, 10 ve 15'lik konsantrasyonlarından hazırlanmış sterilant içerisinde bir kontrol grubuyla birlikte 30 d çalkalandılar. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar, 5 defa 5 d olmak üzere steril saf su içerisinde çalkalanarak sterilantın etkisi giderildi. Tohumların üzerindeki testanın soyulmasını kolaylaştırmak için yaklaşık 1 saat steril saf suda bekletildi. Steril kabin içerisine alınan tohumların testası uzaklaştırıldıktan sonra, steril edilmiş kurutma kağıtları arasında kurutularak BBD'siz MS besi ortamında kültüre alındı.

3.3.1.2. Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna %10'lik NaOCl'de Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde kontrollü melezleme ile elde edilen melez *Pistacia* tohumlarının yüzey sterilizasyonu ve *in vitro* çimlenmesi üzerine NaOCl'nin farklı bekletme sürelerindeki etkisi araştırılmıştır. Tohumlar endokarptan uzaklaştırmak için çekiçle kırıldı. Endokapları çıkarılan tohumlar 5 d steril saf suda yıkandı. Daha sonra NaOCl'nin 10'lik konsantrasyonunda 5, 10 ve 20 d süreyle bir kontrol grubuyla birlikte çalkalandı. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar 5 defa 5 d olmak üzere steril saf su içerisinde çalkalanarak NaOCI'den arındırıldı. Tohum üzerindeki testanın daha kolay soyulabilmesi için kolaylaştırmak için yaklaşık 1 saat steril saf suda bekletildi. Steril

kabin içerisine alınan tohumların testası uzaklaştırıldıktan sonra, steril edilmiş kurutma kağıtları arasında kurutularak BBD'siz MS besi ortamında kültüre alındı.

3.3.2. Kültür Başlatma Çalışmaları

Proliferasyon çalışmalarında kullanılacak olan sürgünlerin elde edilebilmesi amacıyla yapılan kültür başlatma çalışmalarında, melez *Pistacia* tohumları kullanıldı. Sterilizasyon işlemi tamamlanan materyaller, deney kapsamında BBD içermeyen ve 1 gl^{-1} BA içeren besi ortamlarında kültüre alındı. Magenta GA-7 kültür kaplarına veya cam şişelere 50 - 60 ml besi ortamı konuldu. Her kültür kabına tohum deneyi için 5'er tohum kültüre alındı. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.3.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Çimlenme çalışmaları süresince yapılan deneylerdeki her uygulama için 20 tohum kullanıldı. 14 günlük kültür sonunda aşağıdaki ölçümler yapıldı; ortalama sürgün sayısı; ortalama sürgün uzunluğu (mm); ortalama kök uzunluğu (mm); ortalama nod sayısı: aşı yeri çapı.

Tohum çimlenme çalışmaları için yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

3.3.2.1.Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'siz Ortamın Etkisi

Bu deneyde, *Pistacia* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine BBD içermeyen ortamın etkisi incelenmiştir. Her uygulama için MS besi ortamına 30 gl^{-1} sukroz, 6.5 gl^{-1} agar ilave edilmiştir.

3.3.2.2.Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'li Ortamın Etkisi

Bu deneyde, *Pistacia* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine BA etkisi incelenmiştir. Her uygulama için BA 1 mgl^{-1} konsantrasyonda kullanılmış ve MS besi ortamına 30 gl^{-1} sukroz, 6.5 gl^{-1} agar ilave edilmiştir.

3.3.2.3. *İn vitro* Çimlenmiş Tohumların Aklimitizasyonu

İn vitro ortamda herhangi bir büyüme düzenleyicisi olmayan MS besi ortamında çimlendirilen melez genotiplerden elde edilen bitkiciklerin dış ortam koşullarına alıştırılması 16/8 fotoperiyotlu ışık yoğunluğu 30 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ olan bir büyüme odasında yapıldı. Çimlenme ortamında 42 gün kaldıktan sonra köklenmiş sürgünler musluk suyunda 1 saat boyunca yıkandıktan sonra, ticari olarak satılan torfta bitkininin doğal şartlara alıştırılması işlemi üzerine etkisi araştırıldı.

3.3.3. Stok Kültürlerin Elde Edilmesi

Bu melez genotipler arasından kültür şartlarında en iyi çimlenme özelliği gösteren 3 genotip seçildi. Seçilmiş olan bu melez genotipler arasından da sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, nod sayısı ve aşı yerleri kalınlığı bakımından en iyi gelişen tohum tespit edildi ve 3 genotip; ***P. vera* × *P. vera (Klon-I)***, ***P. khinjuk* × *P. atlantica* (*Klon-II*)** ve ***P. khinjuk* × *P. terebinthus (Klon-III)*** genotiplerine ait tek tohum üzerinden klonlama (mikroçoğaltma) çalışmalarına başlandı. Yapılan ön çalışma sonucunda tek bir tohumdan sürgün gelişimi için en uygun ortam olan 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamında 4 - 5 haftalık altkültürler yapılarak sürgünlerin yaklaşık 12 ay proliferasyonu yapılmıştır.

3.3.4. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları

Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneylerde, materyal olarak tohumlardan elde edilen tek tohumdan gelişen melez stok klonal bitkilerin 1 - 1.5 cm uzunluğundaki sürgün uçları kullanıldı. Proliferasyona alınacak materyallerin bulunduğu kültür kapları steril kabin içerisine alınmadan önce alkol ile silindi. Kültür kaplarından çıkarılan bitkiler, 50 - 60 ml besi ortamı konulan Magenta GA-7 kültür kaplarına dikimleri yapıldı. Her kültür kabı için 4 sürgün ucunun dikimi yapıldı. Dikim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.3.1'te belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. Deneylerdeki her uygulama için en az 20 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür döneminden sonra; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu (mm), kök uzunluğu (mm), nod sayısı ve uç kararması ölçümleri yapıldı.

Sürgün proliferasyonu için yapılan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

3.3.4.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi

P. vera* × *P. vera (Klon-I)*, *P. khinjuk* × *P. atlantica* (*Klon-II*)** ve ***P. khinjuk* × *P. terebinthus (Klon-III) genotiplerine ait tek tohum üzerinden klonlama (mikroçoğaltma) çalışmaları ile elde edilen stok kültürlerin sürgünlerin proliferasyonuna besi ortamı tipinin (MS, SH, WPM) etkisinin araştırıldığı bu çalışmada farklı besi ortamlarına bırakılan sürgünler 1 mgl^{-1} BA ile desteklendi. 28 günlük kültür dönemi sonunda, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu (mm), nod sayısı ve uç kararması verileri kaydedildi.

3.3.4.2. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Kuvvetlerinin Etkisi

Rejenere edilen sürgünlerin proliferasyonuna bir önceki deneyde belirlediğimiz en iyi besi ortam tipi olan MS besi ortamının 1/4, 1/2, 1/1, 2 konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı. Besi ortamı 30 gl^{-1} sukroz, 6.5 gl^{-1} agar ve 1 mg l^{-1} BA ile desteklendi. 28 gün sonunda gözlemlenen ve ölçümleri yapılan parametreler kaydedildi.

3.3.4.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Aminoasit Çeşitlerinin Etkisi

Klon-I, ***Klon-II*** ve ***Klon-III*** genotiplerinin standart MS besi ortamına (1 mgl^{-1} BA, 30 gl^{-1} sukroz ve 6.5 gl^{-1} agar) 25 mgl^{-1} olacak şekilde 5 farklı aminoasit olan; valin, triptofan, metiyonin, alanin ve lösin ile bir kontrol grubu şeklinde 6 kombinasyonlu besi ortamında test edildiler. 28 gün sonunda gözlemlenen ve ölçümleri yapılan parametreler kaydedildi.

3.3.4.4. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Karbonhidrat Tiplerinin Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* rejenerantların proliferasyonuna, farklı şeker tiplerinin (sukroz, fruktoz, glikoz, laktoz) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte incelenmiştir. Belirtilen şeker tiplerinden her bir uygulama için 30 gl^{-1} kullanılmıştır. MS besi ortamına 6.5 gl^{-1} agar ve 1 mg l^{-1} BA ilave edilmiştir.

3.3.4.5. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Önceki deneyde sürgün çoğaltılması çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen karbonhidrat çeşidinin farklı konsantrasyonları (%2, %3, %4, %6) bir kontrol grubu ile birlikte çalışılmıştır. Değerlendirilen parametreler 28 gün sonunda rapor edilmiştir.

3.3.4.6. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Çeşidinin Etkisi

Apikal sürgün uçları kullanılarak sürgün proliferasyonuna farklı sitokininlerin (1 mgl^{-1}; BA, 2iP, TDZ, Zeatin, Kinetin) etkisi araştırıldı. Sürgün proliferasyonuna en iyi cevap veren sitokinin belirlendi.

3.3.4.7. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Sitokinin Konsantrasyonunun Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* rejenerantların proliferasyonuna, farklı BA konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 4, 8 mgl^{-1}) etkisi bir kontrol grubuyla birlikte incelenmiştir. Her uygulama için MS besi ortamına 30 gl^{-1}sukroz, 6.5 gl^{-1}agar ilave edilmiştir.

3.3.4.8. Sürgün Proliferasyonuna Sitokinin - Oksin Kombinasyonunun Etkisi

Bu deneyde proliferasyon koşullarının iyileştirilmesi amacıyla, ***Klon-I*** için 2 mgl^{-1} BA ve ***Klon-II*** ve ***Klon-III*** için 1 mgl^{-1} BA içeren standart MS besi ortamına oksin ilavesinin (IAA, NAA ve IBA; her biri 0.2 - 0.5 mgl^{-1}) etkileri araştırıldı. Dört haftalık kültür dönemi sonucunda elde edilen verilere istatistiksel işleme tabi tutulmuş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3.3.5. Köklendirme Çalışmaları

Sürgünlerin proliferasyonu sonucu ortaya çıkan materyallerin köklendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda; 25 mm uzunluğundaki sürgünler kullanılmıştır. Sürgünlerin alt tarafından 1 cm'lik kısmın yaprakları temizlendikten köklenme ortamına aktarılmıştır. Köklendirme deneyleri kapsamındaki uygulamaların her biri için ortalama 10 sürgün kullanılmış ve 28 günlük kültür periyodu sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır.

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

Ortalama Kök Sayısı; köklenen her bir sürgündeki kök sayısının ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama Kök Uzunluğu (mm); köklenen sürgünlerdeki kök uzunluğunun ortalamasını ifade etmektedir.

Sürgünlerin köklendirilmesi çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.5.1. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

İn vitro şartlarda prolifere olan 1.5 – 2 cm uzunluğundaki köklenmeye uygun olan sürgünlerin köklendirilme çalışmaları için dört farklı oksinin (her biri 1.0 mgl^{-1} IAA, IBA, NAA, 2,4-D) etkileri çalışıldı. 28 günlük kültür sonunda köklenme oranı (%) ve oluşan kök sayısı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlandı.

3.3.5.2. Sürgünlerin Köklenmesine En İyi Oksin Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

İn vitro'da elde edilen sürgünlerin en iyi köklenme ortamındaki oksin çeşidinin 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mgl^{-1} konsantrasyonlarının etkileri araştırıldı.

3.3.5.3. Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi

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

3.3.6. Aklimatizasyon Çalışmaları

İn vitro'da köklenmiş melez klonal bitkilerinin doğal ortam koşullarına alıştırılmasında ilk aşama olan aklimatizasyon (alıştırma) için ticari torf kullanılmıştır. Bitkiler köklenme ortamından çıkarılıp musluk suyu altında yıkanarak, su içerisinde bir süre bekletildikten sonra tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve sterilize edilmemiş ticari torf içeren plastik saksılara dikilmişlerdir. Dikim işleminden sonra sulanan bitkilerin üzerleri 50 ml'lik cam beherlerle kapatılarak Bölüm 3.2.3.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sulama işlemi düzenli olarak yapılmakta ve dikimi yapılan bitkilerin üzeri 7. günden itibaren aşamalı olarak (7. günde 10 d, 8. günde 20 d, 9. günde 1 saat, 10. günde 2 saat, 11. günde 4 saat) açılmak suretiyle ortamın nemi kontrol altında tutulup bitkinin dış ortam koşullarına alıştırılmaya başlanmıştır. Üzeri aşamalı olarak açılan bitkilerin bir haftalık bir süre sonunda tamamen açılmıştır. Aklimatizasyon işlemlerinde 3 farklı torf kullanılmıştır. Bunlar;

a. Sterilize Edilmiş Torf; birer litre olacak şekilde 2 kat alüminyum folyoya sarılarak paketlenmiş torf, 1 atmosfer basınçta 121º C'de 25 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiş torfu ifade eder.

b. Yarı Sterilize Edilmiş Torf; sterilize edilmiş torf ile sterilize edilmemiş torfun 1:1 oranında karışımından oluşan torfu ifade eder.

c. Sterilize Edilmemiş Torf; sterilize edilmeden kullanılan torfu ifade eder.

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışma sonuçlarındaki değişkenlikleri belirleyebilmek için sonuçlarının tanımlayıcı analizleri **SPSS 13.0** paket programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için veriler **Tek Yönlü ANOVA**'ya (**One–Way ANOVA**) diğer bir adıyla "**F Testi = Varyans Analizi**"ne tabi tutulmuştur. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ seviyesinde **DUNCAN** çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

$P > 0.05$ = İstatistiksel olarak fark önemli değil.

$0.01 < P < 0.05$ = İstatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

$0.001 < P < 0.01$ = Yüksek düzeyde anlamlı fark vardır.

$P < 0.001$ = Çok yüksek düzeyde anlamlı fark vardır.

$0.05 < P < 0.10$ = Sınırda anlamlılık "marginally significant" anlamına gelir.

3.5. Somaklonal Varyasyon Çalışmaları

3.5.1. Bitki Materyali

Gaziantep Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü uygulama bahçelerinde bulunan *Pistacia* cinsinin tescilli 4 farklı türünün (*P. khinjuk* Stocks, *P. vera* L., *P. terebinthus* L. *ve P. atlantica* Defs.) hem erkek hem de dişi genotipleri arasında yapılan kontrollü tozlaşma ile tür içi ve türler arası melezlemeden elde edilen ***P. khinjuk* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. atlantica***, ***P. vera* × *P. atlantica***, ***P. terebinthus* × *P. terebinthus***, ***P. khinjuk* × *P. khinjuk***, ***P. vera* × *P. vera***, ***P. vera* × *P. terebinthus*** ve ***P. vera* × *P. khinjuk*** genotiplerinin tohumları arasında kültür şartlarında en iyi çimlenme

özelliği gösteren bitkicikler seçildi. *Pistacia* genotiplerine ait seçilen bu tek tohum üzerinden klonlama (mikroçoğaltma) çalışmalarına başlandı. Yapılan ön çalışma sonucunda tek bir tohumdan sürgün gelişimi için en uygun ortam olan 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamında 4 - 5 haftalık altkültürler yapılarak sürgünlerin yaklaşık 12 ay proliferasyonu yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, ***P. khinjuk* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* × *P. atlantica*, *P. vera* × *P. atlantica*, *P. khinjuk* × *P. khinjuk*, *P. vera* × *P. vera*** ve ***P. vera* × *P. terebinthus*** genotiplerine ait bitkilerde, klonal mikroçoğaltma aşamasında oluşabilecek olası genetik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, ISSR ve IRAP moleküler belirteçleri kullanılarak oluşan somaklonal varyasyon belirlenmiştir. Bu amaçla, *P. khinjuk* × *P. terebinthus*, *P. khinjuk* × *P. atlantica*, *P. vera* × *P. atlantica*, *P. khinjuk* × *P. khinjuk*, *P. vera* × *P. vera* ve *P. vera* × *P. terebinthus* çeşidine ait ağaçlardan alınan tohumlar steril edilerek başlatılan *in vitro* çimlendirilen ve 5, 9 ve 12. ay altkültürlenen bitkiler (Klon 5-1, 5-2, 9-1, 9-2 12-1 ve 12-2) birinci altkültürden elde edilen bitkiler kontrol grubu olmak üzere somaklonal varyasyonların belirlenmesinde materyal kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.5.2. CTAB Yöntemi ile Genomik DNA İzolasyonu

6 melez *Pistacia* genotipine ait klonal yaprak örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu CTAB yöntemi (**Lodhi ve ark. 1994**) ile aşağıda belirtilen sırada gerçekleştirildi:

- ✓ Derin dondurucuda saklanan yapraklar 50 mg tartılıp, homojenizatör (Retchs MM 400) yardımı ile sıvı azotla ezildi.
- ✓ 0.5 ml CTAB ekstraksiyon çözeltisi eklenerek ezilen yapraklar karıştırıldı.
- ✓ Karışım, 15 ml'lik falkon tüplere konuldu.
- ✓ Çözelti üzerine, 0.5 mg PVP eklendi ve tüp birkaç kez çalkalandı.
- ✓ Daha sonra bu karışım, 60˚ C'lık sıcak su banyosunda 25 dakika bekletildi. Bu sürenin ardından tüpler oda sıcaklığında soğutuldu.
- ✓ Karışıma 0.6 ml kloroform/oktanol eklenerek 20 - 25 defa hızla çalkalandı ve karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Üst faz yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
- ✓ Elde edilen çözeltiye 0.05 hacim 0.5 M NaCl eklenerek iyice karıştırıldı.

- ✓ Çözeltiye 0.1 hacim soğuk (-20˚ C) %95'lik etanol eklendi ve 4˚ C'ta DNA iplikçikleri görülebilene kadar bekletildi.
- ✓ Daha sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüjden sonra üst sıvı dökülüp pelet soğuk %76'lık etanol ile yıkandı.
- ✓ Tüpler 37˚ C'de etüvde etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildi.
- ✓ DNA steril distile suda çözüldü.
- ✓ Örneklere son derişimi 0.01 mg/m1 olacak şekilde 1 mg/ml RNaz A çözeltisi eklenerek 37º C'ta 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyondan sonra örneklere 0.1 mg/mL proteinaz K çözeltisi son derişimi 0.001 mg/mL olacak şekilde eklendi ve 37º C'de 30 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Karışımın üstüne eşit hacimde kloroform/oktanol eklenerek 20 - 25 defa hızla çalkalandı ve karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilir.
- ✓ Üst faz yeni bir ependorf tüpe aktarıldı ve elde edilen çözeltiye 0.05 hacim 0.5 M NaCI eklenerek iyice karıştırıldı.
- ✓ Çözeltiye 0.1 hacim soğuk (-20 ˚C) %95'lik etanol eklenip, 4˚ C'ta DNA iplikçikleri belirlenene kadar bekletildi.
- ✓ Daha sonra oda sıcaklığında sırasıyla 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, üst sıvı döküldü ve pelet 4˚ C'ta soğutulan %76'lık etanol ile yıkandı.
- ✓ Tüpler 37˚ C'de etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildikten sonra DNA, steril distile suda çözüldü.
- ✓ İzolasyonu gerçekleştirilen gDNA'ların nanodrop spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapılıp, gDNA'nın miktar tayini ve saflık oranı belirlendi.

3.5.3. ISSR Analizleri

ISSR analizleri için kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. PCR-ISSR reaksiyonları toplam 25 µl hacimde yapılmıştır. ISSR analizlerinde kullanılan termal döngü cihazında gerçekleştirilen PCR döngü koşulları ise Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Kullanılan ISSR primer dizilerine ait baz dizilimleri, Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. ISSR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Konsantrasyon
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
$MgCl_2$,	2 mM
dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP)	80 µM
primer	1 µM
gDNA kalıbı	50 ng
Taq DNA polimeraz (Intron Biotechnology, *i*-Taq™)	2U

Çizelge 3.3. ISSR reaksiyonunda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları

İşlem Sırası	PCR Aşamaları	Sıcaklık (° C)	Süre	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	95° C	5 d	1
2.1.	Denatürasyon	95° C	30 sn	35
2.2.	Primerin DNA'ya bağlanması	55° C	90 sn	
2.3.	Uzama aşaması	72° C	90 sn	
3.	Son uzama aşaması	72° C	8 d	1

Çizelge 3.4. ISSR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri

Primer Adı	Baz dizilimi (5′ → 3′)
ISSR1	GAG AGA GAG AGA GAG AT
ISSR2	GAG AGA GAG AGA GAG AC
ISSR4	GAA GAA GAA GAA GAA GC
ISSR5	AGA GAG AGA GAG AGA GT
ISSR6	AAC TCT CTC TCT CTC T

ISSR-PCR amplifikasyon ürünleri (15 µL), 1×TAE tamponu içerisinde hazırlanan %1.5'lik agaroz jele yüklenip, 80 V'da 70 d yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak, ultraviyole ışık altında dijital olarak görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.5.4. IRAP Analizleri

IRAP analizlerinde IRAP 2, 4, 5, 7, 9, 10 ve AYF2 primerleri **(Smykal ve ark. 2011)** ile amplifikasyon reaksiyonu için, kullanılan Çizelge 3.5.'de verilmiştir. AYF2 primeri **(Kuhn ve ark. 2017)** ile amplifikasyon reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 3.6.'da verilmiştir. PCR-IRAP (2, 4, 5, 7, 9, 10 ve AYF2 primeri) reaksiyonları toplam 25 µl hacimde yapılmıştır. IRAP 2, 4, 5, 7, 9 ve 10 primerleri ile yapılan analizlerde kullanılan termal döngü cihazında gerçekleştirilen PCR döngü koşulları ise Çizelge 3.7.'de verilmiştir. IRAP primerleri ile yapılan analizde kullanılan termal döngü cihazında gerçekleştirilen PCR döngü koşulları ise

Çizelge 3.8.'de verilmiştir. Kullanılan IRAP primer dizilerine ait baz dizilimleri, Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. IRAP reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	**Konsantrasyon**
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM (1× PCR tampon)
$MgCl_2$,	2 mM
dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP)	80 µM
Primer	1 µM
gDNA kalıbı	50 ng
Taq DNA polimeraz (Intron Biotechnology, *i*-Taq™)	2U

Çizelge 3.6. AYF2 primeri ile amplifikasyon reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	**Konsantrasyon**
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM (1× PCR tampon)
$MgCl_2$,	2,5 mM
dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP)	100 µM
Primer	1 µM
gDNA kalıbı	50 ng
Taq DNA polimeraz (Thermo Scentific)	1,25U

Çizelge 3.7. IRAP reaksiyonda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları

İşlem Sırası	**PCR Aşamaları**	**Sıcaklık (° C)**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
1.	Ön denatürasyon	95° C	3 d	1
2.1.	Denatürasyon	95° C	15 sn	35
2.2.	Primerin DNA'ya bağlanması	60° C	30 sn	
2.3.	Uzama aşaması	72 °C	1d	
3.	Son uzama aşaması	72° C	10 d	1

Çizelge 3.8. AYF2 primeri ile yapılan reaksiyonda uygulanan sıcaklıklar ve döngü koşulları

İşlem Sırası	PCR Aşamaları	Sıcaklık (° C)	Süre	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	95° C	12 d	1
2.1.	Denatürasyon	95° C	30 sn	35
2.2.	Primerin DNA'ya bağlanması	45° C	90 sn	
2.3.	Uzama aşaması	72° C	90 sn	
3.	Son uzama aşaması	72° C	8 d	1

Çizelge 3.9. IRAP (2, 4, 5, 7, 9 ve 10 ve AYF2) primeri analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri

Primer adı	Baz dizilimi (5′ → 3′)
IRAP2	CTTGCTGGAAAGTGTGTGAGAGG
IRAP4	AGCCTGAAAGTGTTGGGTTGTCG
IRAP5	CTGGCATTTCCATTGTCGTCGATGC
IRAP7	CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC
IRAP9	ATTCTCGTCCGCTGCGCCCCTACA
IRAP10	TGAGTTGCAGGTCCAGGCATCA
AYF2	CAT GCT TGT CCT CGC ATG TCT CTC

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

3.6. ISSR ve IRAP Verilerinin Değerlendirilmesi

ISSR ve IRAP primeri ile elde edilen jel profilleri bant varlığı durumunda 1, bant yokluğunda ise 0 verilerek değerlendirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan veriler MVSP 3.1 software **(Kovach, 1999)** programı kullanılarak analiz edildi. Bu yazılım programı benzerlik indekslerini hesaplayarak genetik farklılıkların hesaplanmasında **Jaccard (1908)** analiz yöntemi, dendogram oluşturulmasında ise UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical average) analiz yöntemi **(Rohlf 1993)** kullanılmıştır. Her bir ISSR veya IRAP belirtecine ait primerlerin polimorfizm bilgi içeriği (PIC, polymorphism information content) değeri **Roldán-Ruiz ve ark. (2000)** kullandığı aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanılmıştır:

$PIC_i = 2f_i (1-fi)$

PIC_i : *i* bantının polimorfik bilgi içeriği

f_i : Bir bantın varolma sıklığı.

Belirteç sistemlerinin ayrımlama kapasitelerinin belirlenmesi için ise Çizelge 3.10.'da gösterilen değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 3.10. Belirteç sistemlerinin ayrımlama kapasitelerini belirlemek için kullanılan yöntemler

	Kısaltma
Polimorfik lokus	*nP*
Monomorfik lokus	*nM*
Toplam lokus	*nL*
Polimorfik lokus oranı	*pP*

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneyler ve bu deneylerden rapor edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Melez *Pistacia* Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Melez tohumların yüzey sterilizasyonu amacıyla uygulanan parametreler arasında her bir genotip için %95 güven düzeyinde yapılan F testi sonucuna göre *P. vera* × *P. vera* canlı kalan tohum ve kahverengileşen tohum yüzdeleri bakımından fark istatistiksel olarak önemli olmazken, enfekte tohum yüzdesi bakımından fark önemli çıkmıştır (Çizelge 4.1.). *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ve *P. khinjuk* × *P. atlantica* genotiplerinde kahverengileşen tohum yüzdeleri bakımından fark istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. *P. vera* × *P. atlantica, P. vera* × *P. khinjuk, P. terebinthus* × *P. terebinthus* ve *P. vera* × *P. terebinthus* genotiplerinde kahverengileşen tohum yüzeleri bakımından fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. 14 günlük kültür sonucu kontrol grubundaki eksplantların tamamı kültürün 3. gününde enfekte olurken, canlı kalan tohum oranı bakımından *P. vera* × *P. vera* ve *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotiplerinde en iyi sonucu % 15'lik NaOCl konsantrasyonu vermiştir. Geri kalan diğer tüm genotiplerde en iyi konsantrasyon %10 olmuştur. Kontrol grubundaki bütün genotipler enfekte olurken %15'lik konsantrasyonda ise hiçbir genotipde herhangi bir kontaminasyon meydana gelmemiştir. %5'lik NaOCl konsantrasyonundaki en yüksek enfeksiyon % 43.59 ile *P. terebinthus* × *P. terebinthus* genotipinde gözlenmiştir. *P. vera* × *P. terebinthus* ve *P. terebinthus* × *P. terebinthus* genotipleri dışında başka bir genotipde %10'luk NaOCl konsantrasyonunda herhangi bir kontaminasyon kaydedilmemiştir. Tohumlardaki kahverengileşme oranına bakıldığında bütün *Pistacia* genotiplerinde NaOCl konsantrasyonu arttıkça kahverengileşme oranında da bir artış olduğu görülmüştür. Çizelge 4.1.'deki veriler bir bütün olarak değerlendirildiği zaman melez *Pistacia* genotiplerine ait tohumlarının yüzey sterilizasyonu için %10'lik NaOCI'in uygulanmasının iyi sonuç verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.1. Melez *Pistacia* tohumlarının yüzey sterilizasyonuna farklı NaOCI konsantrasyonlarının etkisi*

Melezler	Uygulamalar	Canlı Kalan Tohum (%)	Enfekte Olan Tohum (%)	Kahverengileşen Tohum (%)
P. vera* × *P. vera	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	%5 NaOCI	70.00 ± 10.51 b	20.00 ± 9.17 b	5.00 ± 8.19 a
	%10 NaOCI	90.00 ± 6.88 a	0.00 ± 0.00 c	10.00 ± 5.00 a
	%15 NaOCI	95.00 ± 5.00 a	0.00 ± 0.00 c	5.00 ± 6.88 a
		P = 0.065 > 0.05	**P = 0.012 < 0.05**	**P = 0.587 > 0.05**
P. khinjuk* × *P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	65.00 ± 10.94 a	10.00 ± 6.88 b	25.00 ± 9.93 ab
	%10 NaOCI	80.00 ± 9.17 a	0.00 ± 0.00 b	20.00 ± 9.17 ab
	%15 NaOCI	66.00 ± 10.54a	0.00 ± 0.00 b	33.00 ± 10.54 a
s.d: 0.044 (F = 2.702)		-	-	**P = 0.051 > 0.05**
P. vera* × *P. khinjuk	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	55.00 ± 11.41 a	15.00 ± 8.19 b	30.00 ± 10.51 a
	%10 NaOCI	75.00 ± 9.93 a	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 9.93 ab
	%15 NaOCI	60.00 ± 11.23 a	0.00 ± 0.00 c	40.00 ± 11.23 a
s.d: 0.047 (F = 3.452)		-	-	**P = 0.021 < 0.05**
P. vera* × *P. atlantica	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	65.00 ± 10.94 b	0.00 ± 0.00	35.00 ± 10.94 a
	%10 NaOCI	90.00 ± 6.88 a	0.00 ± 0.00	10.00 ± 6.88 b
	%15 NaOCI	80.00 ± 9.17 ab	0.00 ± 0.00	20.00 ± 9.17 ab
s.d: 0.041 (F = 3.548)		-	-	**P = 0.018 < 0.05**
P. terebinthus* × *P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	65.00 ± 10.94 a	43.59 ± 8.04 b	15.00 ± 8.19 ab
	%10 NaOCI	85.00 ± 8.19 a	35.00 ± 7.63 b	30.00 ± 10.51 a
	%15 NaOCI	70.00 ± 10.51 a	0.00 ± 0.00 c	35.00 ± 10.94 a
s.d: 0.045 (F = 3.363)		-	-	**P = 0.023 < 0.05**
P. khinjuk* ×*P. atlantica	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	75.00 ± 9.93 a	10.00 ± 6.88 b	15.00 ± 8.19 ab
	%10 NaOCI	95.00 ± 5.00 a	0.00 ± 0.00 b	5.00 ± 5.00 ab
	%15 NaOCI	75.00 ± 9.93 a	0.00 ± 0.00 b	25.00 ± 9.93 a
s.d: 0.355 (F = 2.577)		-	-	**P = 0.06 > 0.05**
P. khinjuk* × *P. khinjuk	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00	0.00 ± 0.00 c
	%5 NaOCI	40.00 ± 9.017 b	0.00 ± 0.00	60.00 ± 9.00 b
	%10 NaOCI	56.57 ± 9.20 ab	0.00 ± 0.00	43.33 ± 9.20 ab
	%15 NaOCI	68.97 ± 8.70a	0.00 ± 0.00b	30.00 ± 8.50 b
		-	-	-
P. vera* × *P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	%5 NaOCI	80.00 ± 9.17a	30.00 ±10.51 b	10.00 ± 6.88 b
	%10 NaOCI	90.00 ± 6.88 a	5.00 ± 5.00 c	0.00 ± 0.00 b
	%15 NaOCI	75.00 ± 9.93 a	0.00 ± 0.00 c	30.00 ± 10.51 a
s.d: 0.337 (F = 5.065)		-	-	**P = 0.03 < 0.05**

**Veriler kültürün 14. gününde toplam 50 tohumun ortalamasıdır.*

4.1.2. Melez *Pistacia* Tohumlarının Sterilizasyonuna %10'luk NaOCl'de Farklı Bekletme Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde melez tohumların enfekte olmadan çimlenmesi ve dekontaminasyonuna etkisini tespit etmek için önceki deney verileri göz önünde bulundurularak %10'luk NaOCl'de 5, 10 ve 15 d çalkalanarak bir kontrol grubu ile birlikte test edildi ve sonuçlar Çizelge 4.2.'de sunuldu.

Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi uygulanan parametreler arasında her bir genotip için %95 güven düzeyinde yapılan F testi sonucuna göre *P. terebinthus* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. atlantica* ve *P. vera* × *P. terebinthus* genotiplerinde kahverengileşen tohum yüzdeleri bakımından istatistiki olarak fark önemli olmazken, *P. vera* × *P. vera, P. khinjuk* × *P. terebinthus, P. vera* × *P. khinjuk, P. vera* × *P. atlantica* ve *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotiplerinde ise istatistiki olarak önemli farklılılar çıkmıştır. 14 günlük kültür sonucu kontrol grubundakilerin tamamı enfekte olurken, canlı kalan tohum oranı bakımından *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotipinde en iyi sonucu 15 d NaOCl konsantrasyonu vermiştir. Diğer tüm genotiplerde en iyi süre 10 d olmuştur. Kontrol grubundaki bütün eksplantlar enfekte olurken 15 d çalkalama sonucunda ise hiçbir materyalde herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır. %10'luk NaOCl konsantrasyonunda 5 d çalkalama ile en yüksek enfeksiyon oranı %40 ile *P. vera* × *P. vera* genotipinde gözlenmiştir. Tohumlardaki aşırı steril tohum oranına bakıldığında bütün melez *Pistacia* genotiplerinde çalkalama süresi arttıkça kahverengileşme oranında da bir artış olduğu görülmüştür. Canlı kalan tohum yüzdesi bakımından %10'luk NaOCl'de 10 d süresi en yüksek oranı vermiştir. Çizelgedeki veriler bir bütün olarak değerlendirildiği zaman *Pistacia* tohumlarının sterilizasyonu için NaOCl'de bekletme süresinin 10 d çalkalamanın en iyi sonucu verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.2. Melez *Pistacia* tohumlarının sterilizasyonu üzerine %10'luk NaOCI'de çalkalama sürelerinin etkisi*

Melezler	Uygulamalar	Canlı Kalan Tohum (%)	Enfekte Tohum (%)	Kahverengileşen Tohum (%)
P. vera* × *P. vera	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	60.00 ± 11.23 b	40.00 ± 11.23 b	0.00 ± 0.00 b
	10 dakika	89.47 ± 7.23 a	5.00 ± 5.00 c	10.00 ± 6.88 ab
	15 dakika	80.00 ± 9.17 ab	0.00 ± 0.00 c	20.00 ± 9.17 a
s.d: 0.029 (F = 2.787)		-	-	**P = 0.046 < 0.05**
P.khinjuk* × *P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	70.00 ± 10.51 a	20.00 ± 9.17 b	10.00 ± 6.88 ab
	10 dakika	80.00 ± 9.17 a	0.00 ± 0.00 c	20.00 ± 9.17 ab
	15 dakika	70.00 ± 10.51 a	0.00 ± 0.00 c	30.00 ± 10.51 a
s.d: 0.040 (F = 2.754)		-	-	**P = 0.048 < 0.05**
P. vera* × *P. khinjuk	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	80.00 ± 9.17 a	20.00 ± 8.19 b	0.00 ± 0.00 b
	10 dakika	90.00 ± 6.88 a	5.00 ± 0.00 c	5.00 ± 5.00 b
	15 dakika	75.00 ± 9.93 a	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 9.93 a
s.d: 0.029 (F = 4.852)		-	-	**P = 0.005 < 0.05**
P. vera* × *P. atlantica	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	75.00 ±9.93 ab	20.00 ± 9.17	5.00 ± 5.00 b
	10 dakika	90.00 ± 6.88 a	0.00 ± 0.00 c	10.00 ± 6.88 b
	15 dakika	65.00 ± 10.94 b	0.00 ± 0.00 c	35.00 ± 10.94 a
s.d: 0.037 (F = 5.032)		-	-	**P = 0.003 < 0.05**
P. terebinthus* ×*P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	60.00 ± 11.23 a	25.00 ± 9.93 b	15.00 ± 8.19 ab
	10 dakika	80.00 ± 9.17	5.59 ± 5.00 c	20.00 ± 9.17 a
	15 dakika	75.00 ± 9.93 a	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 9.93 a
s.d: 0.040 (F = 1.867)				**P = 0.142 > 0.05**
P. khinjuk* × *P. atlantica	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	65.00 ± 10.94 a	15.00 ± 8.19 b	20.00 ± 9.17 ab
	10 dakika	84.21 ± 8.59 a	0.00 ± 0.00 c	15.00 ± 8.59 ab
	15 dakika	73.68 ± 10.37 a	0.00 ± 0.00 c	26.00 ± 10.37 a
s.d: 0.041 (F = 1.948)				**P = 0.129 > 0.05**
P. khinjuk* × *P. khinjuk	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 b c	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	60.00 ± 11.23 b	40.00 ±11.23 b	10.00 ± 6.88 b
	10 dakika	85.00 ± 8.19 a	5.00 ± 5.00 c	15.00 ± 8.19 ab
	15 dakika	95.00 ± 5.00 a	0.00 ± 0.00 c	35.00 ± 10.94 a
s.d: 0.041 (F = 3.700)				**P = 0.015 < 0.05**
P. vera* × *P. terebinthus	**Kontrol**	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
	5 dakika	75.00 ± 9.93 b	30.00 ± 10.51 b	5.00 ± 5.00
	10 dakika	95.00 ± 5.00 a	0.00 ± 0.00 c	15.00 ± 8.19
	15 dakika	90.00 ± 6.88 ab	0.00 ± 0.00 c	20.00 ± 9.17
s.d: 0.033 (F = 1.891)				**P = 0.138 > 0.05**

**Veriler kültürün 14. gününde her genotip için en az 50 tohumun ortalamasıdır.*

4.2. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Odunsu bitkilerde *in vitro* tohum çimlenme oranının düşük olması; hastalık-zararlılardan arındırılmış aksenik eksplantlar elde edilmesi veya doğal olarak büyüyen yaşlı ağaçlardan ya da genç fidelerden bulaşıksız aksenik eksplantların elde edilmesi ve aksenik sürgünlerin bazal kısmında fenoliklerin salınması *in vitro* doku kültürü başlatılmasında karşılaşılan önemli sorunlar arasındadır.

İn vitro'da eksplantlardan kültür başlatmak bütün bitkilerde bulunan iç kaynaklı mikroorganizmalar içermesinden dolayı zordur. Odunsu bitkilerde kültürün başarısızlığının en önemli faktör bakteri ve mantar kaynaklı kontaminasyondur. Bu mikroorganizmaların elimine edilmesi zor olabilir ve aksenik kültürün başlatılmasını sınırlayabilir. Bu problemin üstesinden gelebilemek için bitki materyalinin dezenfeksiyonuna ihtiyaç vardır. Sterilizasyon işlemi kadar sterilizasyonunu yapıldığı ortamında bakterisiz olması gerekmektedir. Doku kültürü çalışmalarına başlamanın en önemli kırılma noktası sterilizasyon işlemlerinin doğru şekilde yapılmasıdır. Çalışmaların sürdürülebilirliği açısından en önemlisi uygun bir sterilizasyon yapılarak besi ortamına aktarılan aksenik materyal miktarının yüksek olmasıdır. *İn vitro* klonal çoğaltım için, üzerinde çalışılan tüm bitki türlerinin yüzey sterilizasyonu piyasada kolaylıkla bulunan ve etkin maddesi ile klor iyon yüzdesi bilinen her türlü sterilant ile gerçekleştirilebilir. Çalışılan bitki türü ve çeşidi için uygun sterilizasyon tekniğinin belirlenmesi ilk ve en önemli aşamadır. Doku kültürü işlemleri sırasında yüzey sterilizasyonu için en fazla kullanılan maddeler arasında etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksit sayılabilir (**Babaoğlu ve ark. 2002**).

Pistacia cinsinin birçok türü ile yapılan doku kültürü çalışmalarında kullanılan tohum, apikal ve lateral tomurcuk gibi çeşitli eksplantlar için ticari olarak satılan (Axion, Domestos) çamaşır suyu ile başarılı bir şekilde yapılmış sterilizasyon sonuçları bulunmaktadır.

Barghchi (1982), olgun antepfıstığı tohumları ile yaptığı çalışmada elde ettiği fidelerin yüzey sterilizasyonu için, öncelikle 45 sn %70'lik etanolde bir ön çalkalama işlemi yapmıştır. Daha sonra 25 d %20'lik NaOCl'de çalkalayarak sterilizasyonun gerçekleştirdiği bildirmiştir.

Ayrıca anaç olarak kullanılan diğer bir *Pistacia* türü olan *P. atlantica*'nın olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonunun üç aşamalı bir işlemle yapıldığı **Onay** (**1996**) tarafından rapor edilmiştir.

Onay (**2000a**), olgun antepfıstığı dişi ağaçları sürgün uçları için en uygun dezenfeksiyon işleminin 2 d saf alkolde çalkalamanın ardından %20'lik NaOCl'de 10 - 30 d çalkalayarak dezenfekte edildiğini bildirmiştir.

P. vera L'nın olgun tohumlarından aksenik doku kültürü materyali eldesinin ilk basamağı etkili bir yüzey sterilizasyon metodunun geliştirilmesidir. Birçok araştırıcı tarafından antepfıstığı tohumlarından aksenik doku kültürü materyali geliştirme sırasında karşılaştıkları en büyük sorun bakteri ve mantar kontaminasyonları olmuş ve bu sorunun ortadan kaldırılması ile ilgili çalışmalar farklı araştırıcılar tarafından gerçekleştirilmiştir (**Barghchi 1982; Bustamante-Garcia 1984; Abousalim 1990**). Bu araştırıcılar arasında sistematik olarak optimum sterilizasyon koşullarını çalışan **Abousalim** (**1990**) olmuştur. Farklı yüzey sterilant ajanlarının farklı zaman periyotları ile ayrıntılı bir karşılaştırma yapmıştır. **Abousalim** (**1990**), antepfıstığı tohumlarının yüzey sterilizasyonu suda eriyen bir ajan olan %0.1 Tween 20 ilave edilmiş %20'lik NaOCI kullanarak bir çalkalayıcı veya vakumlu infiltrasyon sistemi ile sterilizasyon çalışmasını yapmış ve 14 günlük kültür sonrasında %10'dan daha düşük kontaminasyon oranıyla karşılaşıldığı bildirilmiştir.

Tilkat (**2003**), antepfıstığının diğer bir anacı olan *P. khinjuk* Stocks'un olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonunun, %20'lik NaOCl'de 30 d bekletilme işlemi sonucunda eksplantların 5'şer kez 5 defa steril distile saf su ile çalkalanmasıyla başarıldığını rapor etmiştir.

Tilkat ve ark. (**2005**), tarafından yapılan sterilizasyon işleminde %20'lik NaOCl'de 30 d çalkalanarak yapılan yüzey sterilizasyon işleminin *P. khinjuk*'un olgun tohumlarını dezenfekte ettiği rapor edilmiştir.

Can ve ark. (**2006**), tarafından *P. khinjuk, P.terebinthus, P. atlantica,* ve *P.mutica* tohumlarında yapılan sterilizasyon çalışmasında öncelikle %70 etanolde 5 d çalkalamanın ardından 1 defa steril saf suda yıkamıştır. Daha sonra bu işlemle beraber 15 d %15'lik ticari NaOCl'de çalkalama ve 1 defa steril saf su ile yıkama yapmıştır. Son işlem olarak tohumlar 2 d boyunca %70'lik etanolde çalkalanıp etanolden

arındırmak için 3 defa steril saf su ile yıkanması halinde başarılı bir yüzey sterilizasyonu gerçekleştiği rapor edilmiştir.

Hussain (**2012**), *P. vera* tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi için yapılan yüzey sterilizasyonunda öncelikle tohumlar musluk suyu ile yıkanıp daha sonra 1 d %90'lık etil alkolde çalkalanıp ve son olarak 15 d %1'lik civa klorürde ($HgCI_2$) çalkalanarak başarılı sterilizasyon elde edileceğini bildirmiştir.

Parfitt ve Almehdi (**1994**), tarafından *in vitro* ortamda yetişen bitkilerin fotosentezini teşvik etmek için ışık miktarını arttırarak %2'lik atmosferik CO_2 kullanılmasıyla kontaminasyonun kontrol altına alındığını rapor etmişlerdir.

Onay (**1996**), *P.vera* L. tohumlarının dekontaminasyonu ve çimlenmesi üzerine yaptığı çalışmada; tohumlar bir kontrol grubuyla birlik de %5, %10 ve %20 NaOCl çözeltisinde 10 d sterilizasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemin sonucunda %62.5 oranında bir çimlenme ve en düşük % 37.5 kontaminasyon oranı ile %20 NaOCl konsantrasyonunun en iyi sonuç verdiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada optimum NaOCI çalkalama sürelerinin %20'lik NaOCI X 20 d çalkalama en iyi sonuçları verdiği rapor edilmiştir. Eğer çalkalama süreleri artarsa (30 d, 60 d ve 90 d) aksenik tohum sayısının artığı fakat çimlenme oranın azaldığı sonucuna varılmıştır.

Bitki doku kültürü çalışmalarında endojen ve ekzogen kaynaklı bakteri ve mantardan kaynaklı kontaminasyon problemlerinin üstesinden gelebilmek için çeşitli serilant ajanlar kullanılır. Bitki parçalarının sterlizasyonunda kullanılacak yönteme göre bunlar arasında en çok kullanılan sodyum hipoklorit (NaOCI) olmakla birlikte, etil alkol, gümüş nitrat, hidrojen peroksit (H_2O_2) vb. kimyasallar farklı dozlarda kullanılmaktadır. **Onay** (**1996**), tarafından yapılan bir çalışmada %5, %10 ve %15 H_2O_2 konsantrasyonda 10 d sterilizasyona tabi tutulan olgun *P. vera* L. tohumlarında 14 günlük kültür sonrasında %10 H_2O_2 X 10 dk işleminin ardından tohumlarda %40 oranında çimlenme ve %60 oranında bakteri ve mantar enfeksiyonu rapor edilmiştir. Yüksek kontaminasyondan dolayı deneylere hidrojen peroksitle devam edilmemiştir.

Onay (**1996**), tarafından 3 ayrı sterilantın *in vitro* da *P. vera* L. tohumlarının çimlenmesine olan etkisininin değerlendirilmesinin yapıldığı diğer bir çalışmada; öncelikle 2 d saf etanol içinde, daha sonra 10 d %10'luk H_2O_2'de ve son olarak %20'lik NaOCl'de 20 ve 30 d olarak test etmiştir. 14 günlük kültür sonucunda 2 d saf etanol

içinde, daha sonra 10 d %10'luk H_2O_2'de ve 30 d %20'lik NaOCl uygulamasında herhangi bir kontaminasyona rastlanmazken çimlenme oranı %87.5 olarak rapor edilmiştir.

Onay (**2000a**), olgun antepfıstığı dişi ağaçlarından alınan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunun 2 d alkolde bekletilerek yapılan bir ön işlemin ardından 10-30 d arasında %20'lik NaOCl'te çalkalanarak başarılabileceğini bildirmiştir.

Alderson ve Barghchi (**1982**), %20'lik domestos (ticari çamaşır suyu) kullanarak yabani antepfıstığı tohumlarının (*P. vera, P. atlantica, P. khinjuk* Stocks, *P. mutica, P. palaestina*), **Onay** (**2000a**) ise %20'lik ticari çamaşır suyu kullanarak dişi antepfıstığı meristematik dokularının yüzey sterilizasyonunun başarılı bir şekilde elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Yıldırım (**2012**), tarafından rapor edilen bir çalışmada *P. lentiscus* L. (sakız ağacı) tohumlarının ticari sodyum hipokloritte (Axion) 5 d çalkalanarak yüzey sterilizasyonunun gerçekleştirilebileceği ve bu sterilizasyon ile tohumların %66 oranında aksenik olarak çimlendiği belirtildi. Yapılan bu başarılı çalışmanın dışında daha önceden yapılmış herhangi bir sakız ağacı tohumlarının *in vitro* çimlendirilme çalışmasında başarılı bir protokol rapor edilmemiştir.

Çalar (**2013**), tarafından yapılan olgun antepfıstığı (*P. vera* L.) tohumlarının sterilizasyonu üzerine bir çalışmada tohumlar; %5, %10, %15 ve %20 NaOCl ve bir kontrol grubuyla test edildi. 14 günlük kültür sonucu kontrol grubundakilerin %86'sı,%5'lik işlemde tohumların %66'sı, %10'lük işlemde tohumların%36'sı enfekte olurken, %15'likte tohumların %10'u ve %20'lik işlemlerde tohumların hiçbiri enfekte olmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre NaOCl konsantrasyonunun artmasıyla 14 gün kültüre alınan antepfıstığı (*P.vera* L.) tohumlarının enfeksiyon oranının azaldığını göstermiştir. %20'lik NaOCI uygulandığı zaman herhangi bir enfeksiyon gözlenmezken en yüksek enfeksiyonun %86 ile kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Veriler bir bütün olarak değerlendirildiği zaman antepfıstığı tohumlarının sterilizasyonu için %15'lik NaOCI'in 15 d süre ile uygulanmasının iyi sonuç vereceği görülmektedir. Yine aynı çalışmada buttum tohumları için en uygun sterilant konsatrasyonunun %10'luk NaOCI olduğu ve bu konsantrasyonda 15 d çalkalanmasıyla elde edildiği görüldü. *P. atlantica* Desf tohumlarının verdiği sterilizasyon işlemlerinin sonuçlarına göre kontrol

grubundaki tohumların %84'nün enfekte olduğu gözlendi. 14 günlük kültür sonucu %5'lik işlemde tohumların %58'i, %10'lük işlemde %38'i enfekte olurken, %15'likte tohumların %12'si ve %20'lik işlemde %6'sı enfekte olmuştur. NaOCl konsantrasyonunun artmasıyla 14 gün kültüre alınan atlantik sakızı (*P. atlantica* L.) tohumlarının enfeksiyon oranının azaldığını göstermiştir. %62'lik çimlenme oranı, %38'lik enfeksiyon oranı ve aşırı steril tohumun hiç görülmemesi nedeniyle %10 NaOCI konsantrasyonununa ve 15 d el ile çalkalamanın atlantik sakızı tohumlarını sterilizasyonu için en uygun olduğu tespit edilmiştir. Melengiç tohumlarının sterilizasyon işlemlerine bakıldığında çimlenme oranı bakımında en iyi sonuç %10 NaOCI uygulamalarında elde edilirken, en düşük çimlenme oranı enfeksiyon riskinin yüksek olmasından dolayı kontrol grubunda görülmüştür**.** Kontrol grubundaki tohumların %92'si enfekte olmuştur. 14 günlük kültür sonucu %5'lik işlemde tohumların %68'i, %10'lük işlemde %18'i enfekte olurken, %15'likte tohumların %16'sı ve %20'lik işlemde %14'ü enfekte olmuştur. NaOCl konsantrasyonunun artmasıyla 14 gün kültüre alınan melengiç tohumlarının enfeksiyon oranının azaldığı tespit edilmiştir. Neticede melengiç tohumlarının dekontaminasyonu için %10'lik NaOCl konsantrasyonu ile 15 d çalkalamanın en uygun olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Kültür Başlatma Çalışmaları

Tohum çimlenmesi tohumun su alarak şişmesiyle başlar ve genellikle radikulanın uzamanın başlaması ile de son bulur. Kontrollü melezleme ile elde edilen melez *Pistacia* tohumlarından proliferasyon çalışmalarında ve somaklonal varyasyon çalışmalarında kullanılacak aksenik klonal hatların eldesi için, yapılan deneyler ve bu deneylerden elde edilen sonuçlar sırasıyla ilgili alt bölümlerde verilmiştir.

4.3.1. Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'siz Ortamın Etkisi

Bu deney melez *Pistacia* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamının etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Deney sonucunda BBD içermeyen besi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumlardan elde edilen verilere uygulanan istatiksel analizlere göre kök uzunluğu değerleri bakımından genotipler arasındaki fark önemli çıkarken; aşı noktası çapı bakımından gruplar arasında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. %81.25 ile

çimlenme oranı bakımından en yüksek oranı *P. vera* × *P. vera* verirken, %42.85 çimlenme oranı ile en düşük çimlenme oranı *P. terebinthus* × *P. terebinthus* genotipinden elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu *P. vera* × *P. vera* genotipinde 23.55 mm olarak ölçülürken, en kısa sürgün uzunluğu 10.73 mm olarak *P. vera* × *P. atlantica* da ölçülmüştür. Kök uzunluğu, aşı yeri kalınlığı ve nod sayısı bakımından en iyi sonuç *P. vera* × *P. vera* genotipinden elde edilmiştir. Diğer genotipler içinde kök uzunluğu en kısa olan genotip 15.53 mm ile *P. terebinthus* × *P. terebinthus* olurken, nod sayısı bakımından en düşük oranı 2.80 ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* olmuştur. Aşı kalınlığı bakımından en düşük kalınlık 1.10 mm ile *P. terebinthus* × *P. terebinthus* genotipinde ölçülmüştür.

Çizelge 4.3. BBD içermeyen besi ortamında çimlendirilen melez tohumlardan gelişen fidanların özellikleri*****

Melezler	Çimlenme Oranı (%)	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Kök Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Aşı Yeri Kalınlığı ± SH (mm)
P. khinjuk* × *P. terebinthus	54.16 c	11.87 ± 0.08 d	25.56 ± 0.03 b	2.80 ± 0.07 d	1.52 ± 0.07 b
P. khinjuk* × *P. atlantica	60.00 b	12.63 ± 0.06 c	24.55 ± 0.04 b	3.15 ± 0.07 c	1.24 ± 0.07 c
P. vera* × *P. atlantica	46.66 c	10.73 ± 0.04 e	19.71 ± 0.04 d	2.90 ± 0.05 d	1.12 ± 0.03 d
P. terebinthus* × *P. terebinthus	42.85 d	12.55 ± 0.02 c	15.53 ± 0.08 e	3.15 ± 0.04 c	1.10 ± 0.09 d
P. khinjuk* × *P. khinjuk	45.45 c	15.23 ± 0.04 b	21.83 ± 0.01 c	3.55 ± 0.01 b	1.51 ± 0.01c
P. vera* × *P. vera	81.25 a	23.55 ± 0.08 a	29.24 ± 0.01 a	4.35 ± 0.04 a	1.89 ± 0.02 a
P. vera* × *P. terebinthus	58.82 b	11.06 ± 0.05 d	28.25 ± 0.03 a	3.10 ± 0.01 c	1.32 ± 0.01 c
P. vera* × *P. khinjuk	48.52 c	23.42 ± 0.03 a	28.75 ± 0.04 a	3.22 ± 0.06 b	1.45 ± 0.06 b

*Sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

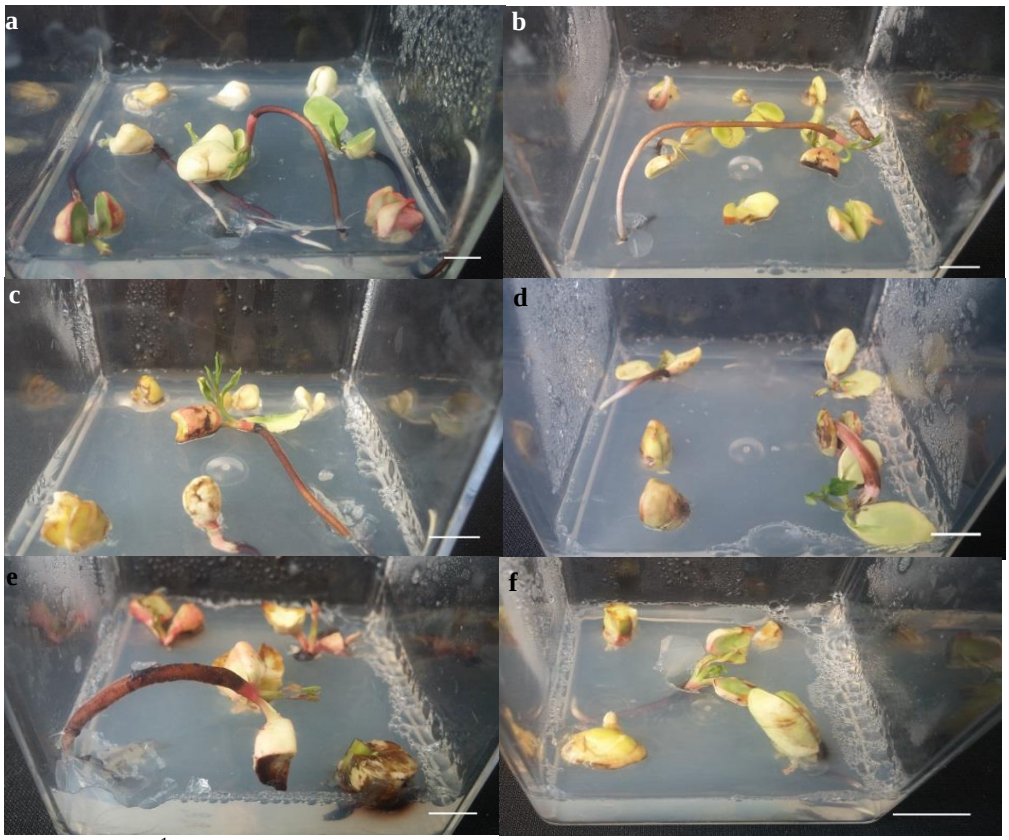
4.3.2. Tohumların *İn Vitro* Çimlenmesine BBD'li Ortamın Etkisi

Bu deney melez *Pistacia* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine BDD içeren besi ortamının etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Her uygulama için MS besi ortamı kullanılmış ve 30 gl^{-1} sukroz, 6.5 gl^{-1} agar ve 1 mgl^{-1} BA ilave edilmiştir. Dikim yapılan kültür kapları büyüme odasında gelişmeye bırakılmış elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.'de sunulmuştur (Şekil 4.1.a., 4.1.b., 4.1.c., 4.1.d., 4.1.e., 4.1.f.). Çimlenen tohumlar 30 gün sonra (Şekil 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7.a., 4.7.b.) besi ortamlarından çıkarılıp aklimatizasyon çalışmaları başlatılmıştır.

Çizelge 4.4. 1 mg/l BA içeren besi ortamında çimlendirilen melez tohumlardan gelişen fidanların özellikleri*

Melezler	Çimlenme Oranı (%)	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Kök Uzunluğu± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Aşı Yeri Kalınlığı ± SH (mm)
P. khinjuk* × *P. terebinthus	26.31 d	26.19 ± 0.01 b	18.24 ± 0.09 c	3.00 ± 0.05 b	1.32 ± 0.06 c
P. khinjuk* × *P. atlantica	46.15 c	19.92 ± 0.09 c	12.30 ± 0.02 e	3.05 ± 0.01 b	1.60 ± 0.05 b
P. vera* × *P. atlantica	83.33 a	12.04 ± 0.01 d	23.14 ± 0.08 b	2.85 ± 0.01 c	1.19 ± 0.07 c
P. terebinthus* × *P. terebinthus	45.80 c	10.97 ± 0.07 e	16.20 ± 0.01 d	3.00 ± 0.03 b	1.18 ± 0.04 d
P. khinjuk* × *P. khinjuk	75.11 b	18.94 ± 0.02 c	12.83 ± 0.03 e	3.00 ± 0.06 b	1.76 ± 0.04 b
P. vera* × *P. vera	85.00 a	31.54 ± 0.07 a	31.23 ± 0.09 a	4.65 ± 0.08 a	1.95 ± 0.02 a
P. vera* × *P. terebinthus	86.70 a	20.16 ± 0.06 c	24.36 ± 0.07 b	3.24 ± 0.07 b	1.80 ± 0.03 a
P. vera* × *P. khinjuk	85.50 a	19.10 ± 0.03 c	31.82 ± 0.05 a	3.12 ± 0.04 b	1.82 ± 0.08 a

*Sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.



Şekil 4.1. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında dikimden 7 gün sonra çimlenmiş tohumlar: **a)** *P. khinjuk* × *P. atlantica* tohumları (Bar: 8 mm), **b)** *P. khinjuk* × *P. khinjuk* tohumları (Bar: 8 mm), **c)** *P. vera* × *P. atlantica* tohumları (Bar: 13.4 mm), **d)** *P. vera* × *P. terebinthus* tohumları (Bar: 5 mm), **e)** *P. vera* × *P. vera* tohumları (Bar: 13.35 mm), **f)** *P. vera* × *P. khinjuk* tohumları (Bar: 13.35 mm)

Deney sonucunda 1 gl^{-1} BA içeren besi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumlardan elde edilen verilere uygulanan istatiksel analizlere göre çimlenme bakımından genotipler arasındaki istatiksel fark önemli çıkarken; aşı noktası çapı bakımından gruplar arasında çok büyük bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. %86.70

ile çimlenme oranı bakımından en yüksek oranı *P. vera* × *P. terebinthus* en iyi sonucu verirken, %26.31 çimlenme oranı ile en düşük çimlenme oranı *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotipinden elde edilmiştir.



Şekil 4.2. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. khinjuk* bitkicikleri **[a)** Bar: 12 mm, **b)** Bar: 22 mm, **c)** Bar: 13 mm**]**

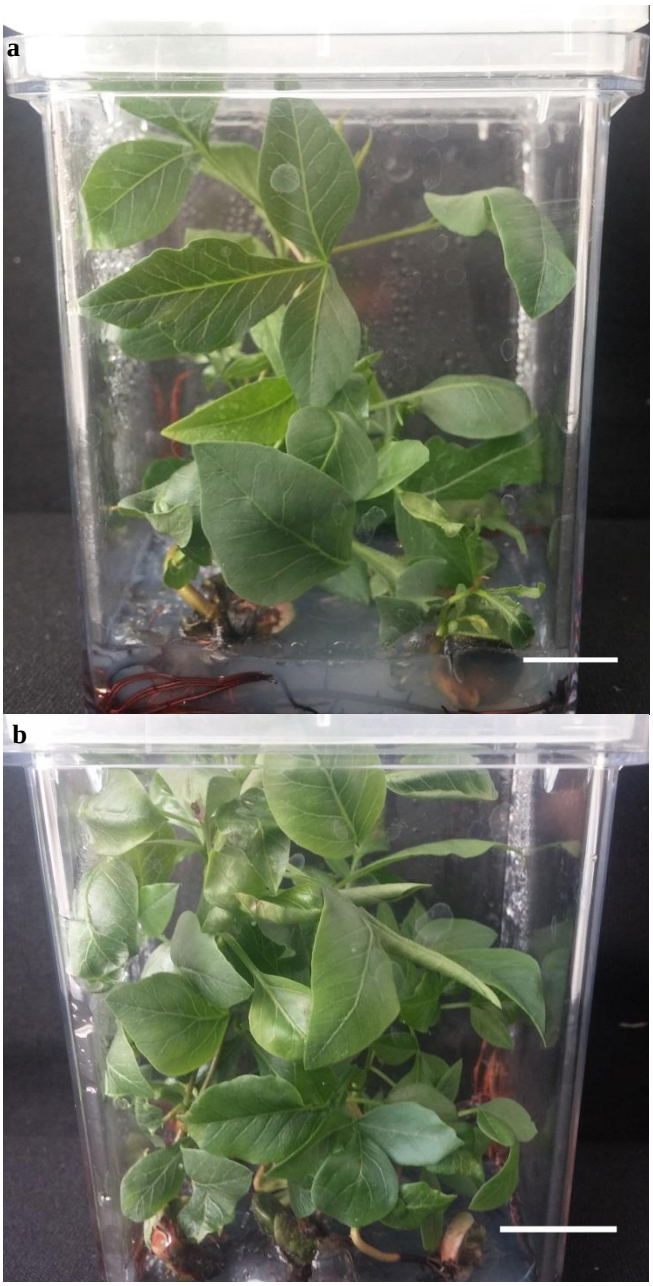
Melez genotipler arasında sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu *P. vera* × *P. vera* genotipi ile 31.54 mm olarak ölçülmüştür. *P. vera* × *P. vera* genotipini 26.19

mm ortalama ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotipi takip etmiştir. Sürgün gelişimleri göz önünde bulundurulduğunda proliferasyon çalışmalarına devam edilebilecek genotipler olarak kaydedilmişlerdir. En kısa sürgün uzunluğu 10.97 mm ile *P. terebinthus* × *P. terebinthus* genotipinde ölçülmüştür.



Şekil 4.3. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. atlantica* bitkicikleri **[a)** Bar: 20 mm, **b)** Bar: 11 mm, **c)** Bar: 13 mm**]**

Kök uzunluğu bakımından en iyi sonucu 31.82 mm *P. vera* × *P. khinjuk* verirken, çok fazla bir fark göstermeyerek *P. vera* × *P. vera* genotipinde kök uzunluğu 31.23 mm olarak ölçülmüştür. En düşük sonucu 12.30 mm ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* genotipi vermiştir.



Şekil 4.4. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. khinjuk* × *P. terebinthus* bitkicikleri **[a)** Bar: 8 mm, **b)** Bar: 14 mm**]**

Aşı yeri kalınlığı ve nod sayısı bakımından en iyi sonuç *P. vera* × *P. vera* genotipinden 1.95 mm ve 4.65 değerleriyle elde edilmiştir. *P. khinjuk* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. atlantica, P. terebinthus* × *P. terebinthus* ve *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotiplernde nod sayısı ortalama 3 olarak ölçülmüştür. En düşük nod sayısını veren genotip ise 2.85 ortalama ile *P. vera* × *P. atlantica* genotipi olmuştur.



Şekil 4.5. 1 gl^{-1} BA içeren MS^{-} besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. vera* × *P. terebinthus* bitkicikleri **[a)** Bar: 13 mm, **b)** Bar: 13 mm**]**



Şekil 4.6. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikimden 30 gün sonra çimlenmiş melez *P. vera* × *P. vera* bitkicikleri ve kök yapısı [**a)** Bar: 13 mm, **b)** Bar: 24 mm, **c)** Bar: 7 mm]

İn vitro ortamda çimlenme özellikleri çalışılan 8 melez *Pistacia* genotiplerinin aşı yeri kalınlıkları değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. vera* genotipi 1.95 mm ile en kalın gövde çapına sahiptir. 1.80 ve 1.82 mm çaplarıyla *P. vera* × *P. terebinthus* ve *P. vera* × *P. khinjuk* genotipleri ikinci sırada yer almışlardır. Antepfısığına anaç olabilmeleri açısından yeri kalınlıkları önem arz etmektedir. En ince aşı yeri kalınlığı ise 1.18 mm ve 1.19 mm ile *P. terebinthus* × *P. terebinthus* ve *P. vera* × *P. atlantica* genotiplerinde ölçülmüştür.



Şekil 4.7. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında tohum dikiminden 30 gün sonra çimlenmiş bitkicikler: **a)** *P. vera* × P. *atlantica* bitkileri (Bar: 16 mm), **b)** *P. terebinthus* × P. *terebinthus* bitkileri (Bar: 10 mm)

4.3.3. *İn Vitro* Çimlenmiş Tohumların Aklimitizasyonu

İn vitro ortamda herhangi bir büyüme düzenleyicisi olmayan MS besi ortamında çimlendirilen melez genotiplerden elde edilen bitkiciklerin (Şekil 4.8.) doğal şartlara alıştırılması 16/8 fotoperiyotlu ışık yoğunluğu 40 μmol m^{-2} s^{-1} olan bir büyüme odasında yapıldı. Çimlenme ortamında 42 gün kaldıktan sonra fidanlar musluk suyunda 1 saat yıkandıktan sonra, sterilize edilmiş ticari olarak satılan torfta bitkininin doğal şartlara alıştırılması işlemleri yapılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'de sunuldu.

Bu deney rejenere olan materyallerin *in vitro* koşullara adaptasyonu için yapıldı. Kültürün 42. gününde çimlenen fidelerin doğal şartlara alıştırılması için tam sterilize edilmiş torf kullanıldı. Üç haftalık ilk adaptasyon süresi ve toprağa aktarıldıktan 2 hafta sonra yaşayan rejenerant yüzdeleri rapor edildi. Her işlem grubu için 20 adet rejenere bitki kullanıldı. Her biri bir adet rejenere olmuş fidan içeren 7 cm çapında plastik saksılardaki bu fidanların üzeri polistren kaplarla ile kapatıldı ve 16/8 saat fotoperiyotlu ve ışık yoğunluğu 40 μmol m^{-2} s^{-1} olan bir büyüme odasına bırakıldı. Kültür odasında saksı içinde 3 günde bir sulanan fideler 5. günde 5 d, 7. günde 10 d, 8. günde 20 d, 9. günde 40 d ve 10. günde 1 saat açık bırakıldılar. 11. günde normal büyüme odası koşullarında 17 gün daha gelişen fideler 28. günde 1:1:1 oranında torf : toprak : kum karışımı içeren 13 cm çapında olan daha büyük saksılara transfer edildiler. Yaşayan fidanlar 2 hafta sonra rapor edildi.

Çizelge 4.5. Melez *Pistacia* genotiplerinin aklimatizasyonu

Melezler	Yaşayan Bitki*(%)	Toprağa Transferden SonraYaşayan Bitki **(%)
P. khinjuk* × *P. terebinthus	80.00 ± 9.17 abc	93.75 ± 6.25 a
P. khinjuk* × *P. atlantica	100.00 ± 0.00 a	89.47 ± 7.23 a
P. vera* × *P. atlantica	60.00 ± 11.23 c	83.33 ± 11.23 ab
P. terebinthus* X *P. terebinthus	70.00 ± 10.51 bc	64.29 ± 13.28 b
P. vera* × *P. khinjuk	90.00 ± 6.88 ab	88.89 ± 7.62 a
P. vera* × *P. vera	95.00 ± 5.00 a	100.0 ± 0.00 a
P. khinjuk* × *P. khinjuk	100.0 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a
P. vera* × *P. terebinthus	100.0 ± 0.00 a	85.00 ± 8.19 ab

*****Sonuçlar aklimitizasyonun 28. gününde 20 bitkinin verilerini göstermektedir.
******Sonuçlar toprağa aktarımın 14. gününde yaşayabilen bitkilerin verilerini



Şekil 4.8. 1 gl^{-1} BA içeren MS besi ortamında çimlendirilmiş alıştırma ortama aktarılmaya hazır köklenmiş 42 günlük *P. khinjuk* × *P. terebinthus* bitkileri (Bar: 48 mm)

Doğal şartlara alıştırma ve toprağa transferden sonra yaşayan fide oranları Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Verilere ANOVA testi uygulandığında kullanılan melez genotipler arasında 28 günlük toprağa alıştırma süresi sonunda yaşayan rejenerant oranlarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Yaşayan bitki bakımından en yüksek hayatta kalma oranını sırsıyla *P. khinjuk* × *P. atlantica, P. khinjuk* × *P. khinjuk, P. vera* × *P. terebinthus* ve *P. vera* × *P. vera* genotipi vermiştir. En düşük yaşayan bitki oranı ise, *P. vera* × *P. atlantica* genotipinde gözlenmiştir. Büyüme odasına transferden 2 hafta sonra bitkicikler yeni yaprak oluşturarak uzamaya başlamışlardır. Dört haftalık kademeli alıştırmadan sonra 1:1:1 oranlarındaki torf : toprak : kum karışımına aktarılan bitkilerin çoğu genotipde yüzde yüze yakını büyüme ve gelişme göstermiştir. Büyüme odasında 2 haftalık bir süre sonunda iyi gelişmiş yeni sürgünler oluşturdular (Şekil 4.9., 4.10., 4.11., 4.12., 4.13.).



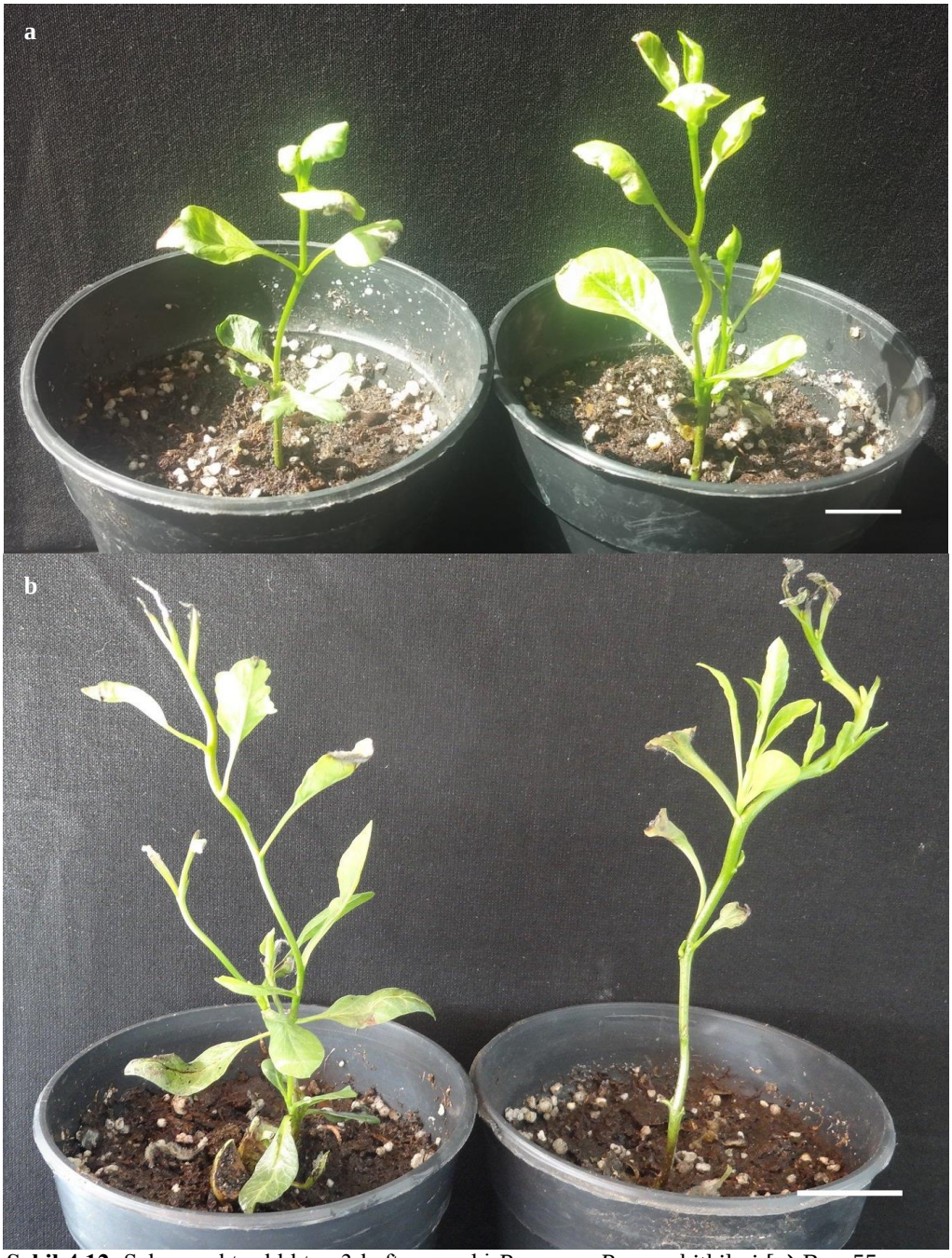
Şekil 4.9. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. terebinthus* bitkisi (Bar: 22 mm)



Şekil 4.10. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. atlantica* bitkisi üstten görünümü (Bar: 30 mm)



Şekil 4.11. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. atlantica* bitkisi (Bar: 27 mm)



Şekil 4.12. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. vera* × *P. vera* bitkileri [**a)** Bar: 55 mm, **b)** Bar:14 mm]



Şekil 4.13. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *P. khinjuk* × *P. khinjuk* bitkileri **[a)** Bar: 29 mm, **b)** Bar: 23 mm**]**

4.4. Kültür Başlatma İle İlgili Genel Değerlendirme

Antepfıstığından *in vitro* kültür başlatılmasında genellikle başlangıç materyali olarak olgun tohumlar, serada 2 - 4 yaşına kadar yetiştirilmiş bitkilerin sürgün uçları ve lateral tomurcukları kullanılmıştır (**Barghchi 1982; Pontikis 1984; Abousalim 1990; Onay 1996, 2000a, 2000b**).

Sınırlı sayıda da olsa özellikle *in vitro* çalışmalarda gereksinim duyulan anaç materyalinin üretimi amacıyla tohum kullanan (**Gentile ve ark. 2002; Mante ve ark. 1989**; **Schmidt ve Ketzel 1996; Hokanson ve Pooler 2000**) araştırıcılar bulunmaktadır.

Barghchi ve Alderson (**1983**), *P. vera* L. klonal çoğaltım için aseptik olarak tohumdan kültür başlatmak amacıyla protokol geliştirmişlerdir. 4 mgl^{-1} BAP ile desteklenmiş MS besi ortamında *P. vera* ve ticari olarak üretimi yapılan "Ohadi" ve "Kallegohi" varyeteleri için sürgün ucu ve yan tomurcuklardan sürgün kültürlerini gerçekleştirmişlerdir.

Onay (**2000a**), 25 yaşındaki olgun antepfıstığı ağaçlarından alınan 3 - 4 cm'lik apikal ve lateral tomurcuklar 1 mgl^{-1} BA içerisine birkaç dakika daldırıldıktan sonra sera ortamında sürgün gelişmesi için torf ve toprak içeren saksılara dikilmiştir. Birkaç gün uygun sıcaklık ve nem ortamı sağlanan serada gelişmeye zorlanan apikal ve lateral tomurcuklaardan gelişen yeni sürgünlerin *in vitro* kültür başlatılması için en etkili eksplantlar olduğunu bildirmiştir.

Olgun antepfıstığı ağaçlarından alınan materyallerin kültüre alınması ve bu eksplantlardan *in vitro* kültür başlatılması sırasında birçok sorunla karşılaşıldığı ve bunlardan en önemlisinin kahverengileşme olduğu **Barghchi** (**1986a**) tarafından rapor edilmiştir. Kahverengileşmenin olduğu kap içindeki eksplantların aynı kap içinde farklı noktalara, ya da farklı kaplara taşınmasıyla eksplantların gelişmesinin yeniden sağlandığını bildirmiştir.

Barghchi ve Martinelli (**1984**), dört yaşına kadar seralarda büyütülmüş damızlık bitkilerden alınan eksplantların kahverengileşme gerçekleştikçe sık sık alt kültürünün yapılmasının iyi sonuç verdiğini rapor etmiştir.

Barghchi (**1985a**), olgun ağaçlardan alınan materyallerin kahverengileşme nedeniyle kültür başlatılmasının zor olduğunu bildirmiştir.

Barghchi ve Martinelli (1984), sterilizasyondan sonra ve kültüre alımdan önce eksplantların 10 - 100 mgl^{-1} malonik asitle bir ön işleme tabi tutulmasının kahverengileşmeyi büyük ölçüde azalttığını ancak önüne geçemediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, *in vitro* kültür başlatılması için budanmış, aşılanmış, BA veya GA_3 püskürtülmüş ya da mikroaşılı ağaçlardan alınan sürgünlerin çok daha uygun materyal oldukları bildirilmiştir (**Barghchi ve Martinelli 1984; Barghchi 1985**).

Barghchi (1985b), 2 yaşına kadar sera şartlarında büyütülen *Pistacia* cinsine ait farklı çeşitlerden {Kerman (dişi), Peters (erkek), Lambertin (dişi ve erkek), Naz (erkek), Red Aleppo (erkek), Ask (erkek) ve Rashti (erkek)} aldığı apikal ve lateral tomurcuklardan itibaren *in vitro* kültür başlatma çalışmalarında; 0.3 mgl^{-1} BA ve/veya 0.5 mgl^{-1} IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında fenolik bileşiklerin salınmasının, 2 mgl^{-1} BA ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlara oranlar daha az oranda gerçekleştiğini bildirmiştir.

Olgun antepfıstığı ve Atlantik sakızı ağaçlarından alınan lateral eksplantların tek başına *in vitro* kültür başlatılmasına yanıt vermediği; yetişkin *P. vera* materyallerinin gençleştirilmesi, GA_3 püskürtme genç fideler üzerine aşılama gibi metotlar uygulandığında yeni sürgün ve tomurcuk oluşumunun arttığı ve gelişen bu sürgünlerden lateral tomurcuk segmentlerinin *in vitro* kültüre olumlu yanıt verdiği **Bustamante - Garcia (1984)** tarafından rapor edilmiştir.

Ak ve ark. (1995), "Siirt" çeşidinin tohum çimlenmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada; tohumların çimlenme oranı, sürgün uzunluğu ve internod uzunluğu belirlemek için GA_3 uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. GA_3 farklı dozlarında (0, 125, 250, 500 ve 1000 ppm) tohumları 24 ya da 48 saat bekletmişlerdir. Bu sonuçlara göre en yüksek çimlenme oranını 125 ppm de ve 48 saat banyo yaptırarak %73.33 olarak belirlemişlerdir. En iyi boy uzunluğu ve nodlar arası uzunluk 1000 ppm'de 48 saat GA_3 uygulaması ile elde etmişlerdir. Bununla birlikte görsel gözlemlere göre sağlıklı fide gelişimi 250 ve 500 ppm GA_3 uygulamalarından elde ettiklerini kaydetmişlerdir.

Abousalim (1990), yaptığı başka bir araştırmada ise dört yaşına kadar sera şartlarında koruma altında yetişen ve bahçe koşullarında 25 yaşındaki antepfıstığı ağaçlarından almış olduğu sürgünleri çalkalayıcı kullanılarak %0.1 Tween 20 içeren

%20 NaOCl ile 20 dakika sterilize ettikten sonra kültüre almış ve kültür başlangıcının ilk safhalarından 3 haftaya kadar karanlıkta tutmuştur. Araştırıcıya göre bu işlem besi ortamının kahverengileşmesini ve dokuların zarar görmesini sınırlamıştır.

Çalar (2013), tarafından 4 *Pistacia* cinsine ait antepfıstığı, buttum, Atlantik sakızı ve melengiç tohumlarının çimlenmesine farklı BBD'lerin (BAP, IBA ve BBD'siz) etkisinin araştırıldığı çalışmada; çimlenme oranı, sürgün uzunluğu ve kök oluşturma değerleri bakımından uygulamalar arasındaki fark önemli çıkarken; aşı noktası çapı bakımından gruplar arasında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. antepfıstığı tohumlarına ait sonuçların; çimlenme oranı bakımından %64 ile 1 mgl^{-1} BAP en iyi sonucu verirken; IBA çimlenme ortamındaki çimlenme oranı %20 olarak en düşük oranda ortaya çıkmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu 1 mgl^{-1} BAP uygulaması 22.14 mm olarak verirken BBD'siz (kontrol) ve IBA uygulamaları aynı grup içerisinde yer almış ve BAP uygulamalarından geride kalmıştır. Kök uzunluğu bakımından BAP ve IBA uygulamaları en iyi sonucu vermiş ve sırasıyla 34.43 mm ve 28.82 mm kök gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Aşı yeri kalınlığı bakımından en iyi sonucu 2.38 mm ile BAP uygulamasının verdiği rapor edildi. Buttum tohumlarında çimlenme oranı %87.14 ile 1 mgl^{-1} BAP uygulamasında en iyi sonucu verirken, BBD'siz (kontrol) çimlenme ortamındaki çimlenme oranı %43.33 olarak en düşük olarak belirlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu 1 mgl^{-1} IBA uygulaması 25.17 mm olarak verirken, kontrol ve BAP uygulamaları aynı grup içerisinde yer almış ve IBA uygulamalarından geride kalmıştır. Kök uzunluğu bakımından IBA ve kontrol uygulamaları en yüksek sonucu vermiş ve sırasıyla 44.53 mm ve 42.14 mm kök gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Aşı yeri kalınlığı bakımından en 14 günlük kültür süresi sonunda iyi sonuç 1.44 mm ile kontrol uygulamasından alınmıştır. Atlantik sakızı tohumlarına ait verilerin ise; çimlenme oranı bakımından %63.41 ile 1 mgl^{-1} BAP destekli besi ortamı en iyi sonucu verirken, IBA destekli ortamındaki çimlenme oranı %24.21 olarak en düşük oranda gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu 1 mgl^{-1} IBA uygulaması 11.05 mm olarak verirken kontrol ve BAP uygulamaları aynı grup içerisinde yer almış ve IBA uygulamalarından geride kalmıştır. Kök uzunluğu bakımından kontrol ve IBA uygulamaları en iyi sonucu vermiş ve sırasıyla 22.85 mm ve 28.58 mm kök gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Aşı noktası çapı bakımından en iyi sonucu 1.44 mm ile IBA uygulaması verirken, diğer

uygulamalar birbirine yakın sonuçları vermesinden dolayı istatistiksel bir farklılık tespit edilmemiştir. Atlantik sakızının sürgün uzunluğu antepfıstığı ve buttuma göre gelişmesi çok daha yavaş gerçekleşmiştir. Bitki yapısı olarak zayıf ve cılız bir anaç olmasına rağmen aşı tutma oranı bakımından herhangi bir sorun yaşanmadığı rapor edilmiştir. Melengiç tohumlarına ait deney sonuçlarına bakıldığında; çimlenme oranı bakımından %53.33 ile 1 mgl^{-1} IBA en iyi sonucu verirken, BAP çimlenme ortamındaki çimlenme oranı %35.56 olarak en düşük oranda ortaya çıkmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu 1 mgl^{-1} IBA uygulaması 20.96 mm olarak verirken, kontrol ve BAP uygulamaları aynı grup içerisinde yer almış ve IBA uygulamalarından geride kalmıştır. Kök uzunluğu bakımından BAP ve IBA uygulamaları en iyi sonucu vermiş ve sırasıyla 16.83 mm ve 13.07 mm kök gelişiminin olduğu gözlenmiştir. Aşı noktası çapı bakımından en iyi sonucu 1.60 mm ile BAP uygulaması verirken diğer uygulamalar yakın sonuçları vermesinden dolayı istatistiksel olarak bir farklılık görülmediği bildirilmiştir.

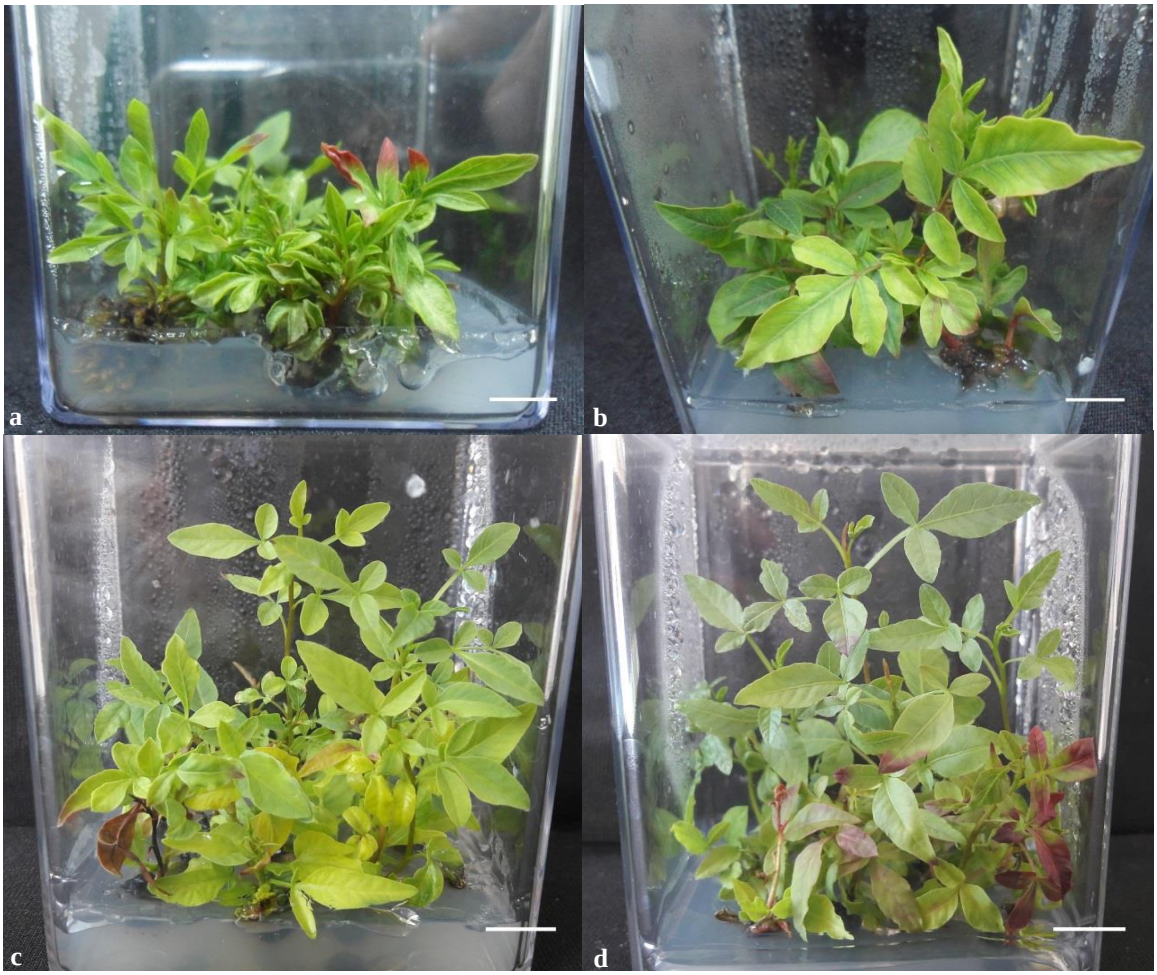
Kültür başlatma çalışmalarında BBD'lerinin etkisini test etmek için **Barghchi** (**1985**), tohumdan aseptik olarak geliştirilen fidelerden elde edilen sürgün uçları üzerinde farklı oksin-sitokinin kombinasyonlarının etkisini test etmek için yaptığı bir çalışmada Kinetin ile birlikte NAA'in sürgün büyümesini durdurduğunu ve kallus gelişimini teşvik ettiğini, sürgün gelişiminin sadece BA ve Kinetin içeren besi ortamlarında en iyi olduğu, BA ve Kinetinin yanına NAA ilavesinin sürgün gelişimini durdurduğu ve kallus oluşumunu teşvik ettiği rapor etmiştir.

Onay (**2000a**), olgun antepfıstığı sürgün uçları ile kültür başlatma için yaptığı çalışmada BA ve 2iP'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında BA'ın 2iP'den daha iyi sonuç verdiğini tespit etmiştir.

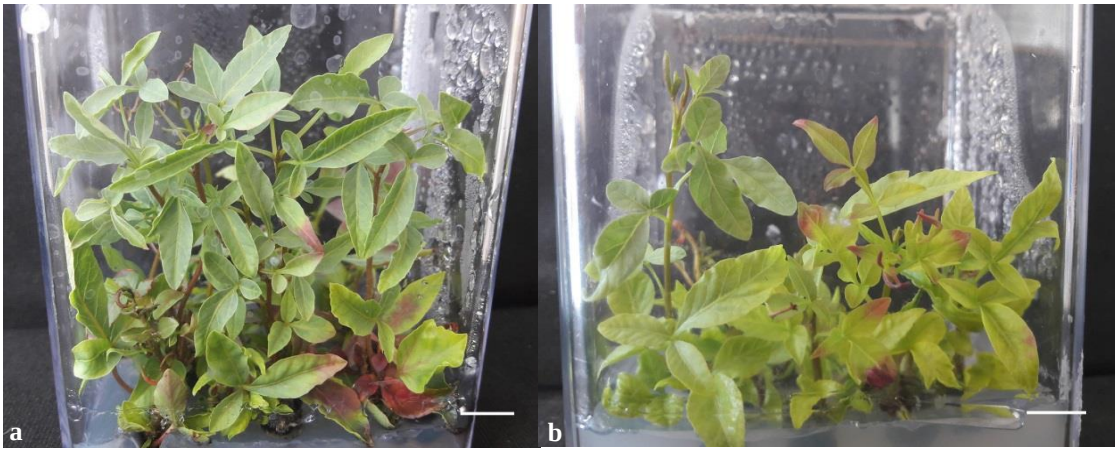
4.5. Aksenik Klonal Hatların Üretimi

Pistacia cinsinin tescilli 4 farklı türünden buttum, antepfıstığı, melengiç ve Atlantik sakızının hem erkek hem de dişi genotipleri arasında kontrollü tozlaştırma ile tür içi ve türler arası melezlemeden elde edilen tohumlar kullanılmıştır. ***P. khinjuk* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. atlantica, P. vera* × *P. atlantica, P. terebinthus* × *P. terebinthus, P. khinjuk* × *P. khinjuk, P. vera* × *P. vera, P. vera* × *P. terebinthus*** ve ***P. vera* × *P. khinjuk*** melez genotipler arasından kültür şartlarında en iyi gelişme

özellikleri gösteren 3 genotip seçildi. Seçilmiş olan bu melez genotipler arasından da sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, nod sayısı ve aşı yerleri kalınlığı bakımından en iyi gelişen genotipler tespit edildi ve 3 genotip; ***Klon-I (P. vera × P. vera)***, ***Klon-II* (*P. khinjuk* × *P. atlantica*)** ve ***Klon-III (P. khinjuk* × *P. terebinthus)*** olarak adlandırıldı. Bu genotiplere ait olan tek tohum üzerinden klonlama (mikroçoğaltma) çalışmalarına başlandı. Yapılan ön çalışma sonucunda tek bir tohumdan sürgün gelişimi için en uygun ortam olan 1 mgl^{-1} BA içeren MS besi ortamında büyüme odasında gelişmeye bırakılan kültürler 4 - 5 hafta sonra altkültürleri yapılarak sürgünlerin yaklaşık 18 ay proliferasyonu yapılmıştır. Yapılan altkültürler sonucunda tez çalışmalarında kullanılacak yeterli miktarda tek tohumdan gelişen melez stok klonal sürgünler elde edilmiştir (Şekil 4.14.a., 4.14.b., 4.15.a, 4.15.b., 4.15.c., 4.15.d.). Klonlar çalışma süresince altkültüre alınarak muhafaza edildi.



Şekil 4.14. Tek tohumdan çoğaltılmış *P. khinjuk* × *P. atlantica* sürgünleri [**a)** Bar: 5 mm **b)** Bar: 10 mm, **c)** Bar: 7 mm, **d)** Bar:10 mm]



Şekil 4.15. Tek tohumdan çoğaltılmış *P. khinjuk* × *P. terebinthus* sürgünleri [**a)** Bar: 6 mm, **b)** Bar: 5 mm]

4.6. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları

Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneylerde materyal olarak, *P. vera* × *P. vera (Klon-I), P. khinjuk* × *P. atlantica* (*Klon-II*) ve *P. khinjuk* × *P. terebinthus (Klon-III)* genotiplerine ait tek tohumdan gelişen melez stok klonal bitkilerin 1cm uzunluğundaki sürgün uçları kullanıldı. Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında yapılan deneyler ve bu deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.6.1. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin Etkisi

Klonlar yeterli eksplant uzunluğu ve sayısına ulaşana kadar 10-12 defa altkültürleri yapıldı. Klonların sürgün çoğaltımına besi ortamı tipinin etkisini belirlemek için MS, SH ve WPM besi ortamlarında apikal sürgünler kültüre alındılar. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutulup ve sonuçlar Çizelge 4.6.'da verildi.

Melez klonlar için denenen farklı besi ortamlarında sürgün proliferasyonu bakımından en iyi sonuç MS besi ortamı olup, sürgün başına düşen eksplant sayısı 2.25 ile 2.00 aralığında olduğu belirlenmiştir. Sürgün başına düşen en fazla eksplant sayısı 2.45 ile *Klon-I*'e ait sürgünlerde kaydedilmiştir. Diğer besi ortamlarının sürgün başına eksplant sayıları incelendiğinde SH ve WPM besi ortamlarındaki melez klonların değişik sonuçlar verdiği görüldü. Elde edilen sonuçlar arasında ortalama gövde uzunluklarına bakıldığında, en uzun gövdeler MS besi ortamında elde edildi. Melez klonlar ortalama gövde uzunluğu açısından değerlendirildiğinde, *Klon-II*'de daha uzun gövdeler elde edildi. Bunlar arasında en uzun sürgün 4 haftalık kültür sonucu MS besi ortamında ortalama 21.22 mm olarak ölçüldü.

Çizelge 4.6. Farklı besi ortamı tiplerinin melez antepfıstığı konlarının *in vitro* gelişmesine etkileri *

Klonlar	Besi Ortamı Tipi gl^{-1}	Ortalama Sürgün Sayısı ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Ortalama Nod Sayısı ± SH	Uç Kararması ± SH (%)
Klon-I	**MS**	2.45 ± 0.21 a	15.61 ± 0.39 a	8.40 ± 0.25 a	12.24 ± 0.04 c
	WPM	1.60 ± 0.11 b	12.15 ± 0.58 b	6.31 ± 0.31 b	34.38 ± 0.08 b
	SH	1.35 ± 0.10 b	9.70 ± 0.41 c	4.66 ± 0.18 c	55.56 ± 0.09 a
		P = 0.000 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.000 < 0.05**	**P = 0.000 < 0.05**
Klon-II	**MS**	2.10 ± 0.17 a	21.22 ± 1.53 a	7.57 ± 0.42 a	14.29 ± 0.54 a
	WPM	1.65 ± 0.10 b	16.80 ± 1.19 b	5.81 ± 0.28 b	30.30 ± 0.81 a
	SH	1.40 ± 0.11 b	14.74 ± 1.18 b	5.00 ± 0.19 b	25.00 ± 0.83 a
		P = 0.002 < 0.05	**P = 0.004 < 0.05**	**P = 0.004 < 0.05**	**P = 0.241 > 0.05**
Klon-III	**MS**	2.00 ± 0.24 a	14.24 ± 0.71 a	7.77 ± 0.29 a	5.66 ± 0.32 b
	WPM	1.95 ± 0.19 b	12.54 ± 0.39 a	5.25 ± 0.25 b	20.00 ± 0.64 ab
	SH	1.25 ± 0.90 c	12.47 ± 0.50 a	8.40 ± 0.38 a	32.00 ± 0.95 a
		P = 0.000 < 0.05	**P = 0.006 < 0.05**	**P = 0.000 < 0.05**	**P = 0.008 < 0.05**

*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Morfolojik olarak yapılan gözlemlere göre yaprak gelişimleri incelendiğinde, MS besi ortamında özellikle de *Klon-II*'ye ait sürgünlerin yaprakları diğer besi ortamların da gelişen sürgünlerin yapraklarına göre daha koyu yeşil renkte ve yaprak ayalarının diğer besi ortamlarında gelişenlere göre daha geniş olduğu gözlenmiştir.

Pistacia türlerinin doku kültürünü başlatmak için ilk girişimler (**Barghchi ve Alderson 1985; Barghchi ve Martinelli 1984; Gonzales ve Frutos 1990; Yang ve Ludders 1993; Dolcet Sanjuan ve Claveria 1995; Onay ve ark. 2004; Tilkat 2006; Tilkat ve ark. 2008; Yıldırım 2012**) 1980'li yılarda başladı. *Pistacia* türleri için doku kültürü birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. *P. vera* L. tohum materyalinden, sürgün ucundan, embriyo kültürlerinden, yaşlı dokulardan *in vitro* vejetatif proliferasyon rapor edilmiştir.

Yang ve Ludders (**1993**), sürgün ucu ve nodal tomurcuklardan sürgün proliferasyonu için farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile destekledikleri MS, modifiye MS, G, WPM ve B-5 ortamlarını kullandılar. MS besi ortamını 0.5 mgl^{-1} BA ve 0.1 mgl^{-1} IBA destekleyerek önemli ölçüde eksplant başına daha fazla sürgün oluşumunu teşvik etmişlerdir. Sürgün boyunda 0.5 mgl^{-1} BA ve 0.1 mgl^{-1} IBA iledesteklenmiş G besi ortmında ½ MS, B-5 ve WPM besi ortamına göre çok daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir.

Pistacia türlerinin mikroçoğaltımı için genellikle MS besi ortamı kullanılmaktadır (**Barghchi 1982; Martinelli 1988; Abousalim 1990**). **Barghchi** (**1985a**), MS besi ortamına karşı Lloyd ve McCown (WPM) besi ortamını test etti ve iki besi ortamı arasında sürgün performansı açısından bir fark bulamadı.

Bustamante-Garcia (**1984**), 6 farklı temel besi ortamları olan; G5, Cheng, modifiye Erikson, Heller, White ve Woody Plant besi ortamlarını *P.* vera L. sürgün proliferasyonu için test ettiler ve nodların sürgün proliferasyon sayısı bakımından en iyi sonucunu filtre kağıt köprüler kullanarak modifiye edilmiş sıvı Erikson besi ortamınında kültüre aldılar.

Abousalim (**1990**), MS besi ortamını Anderson, WPM ve Knop besi ortamları ile kıyasladığında *P. vera* L. sürgün proliferasyonu için üstün olduğunu tespit etti.

Parfitt ve Almendi (**1994**), *P. vera* L.'nin başarılı mikropropagasyonu için besi ortamı modifikasyonlarını çalıştılar. Temel besi ortamlarından DKW seçildi.

Onay (**2000**), *P. vera* L.'nin sürgün büyümesi ve proliferasyonu üzerine yaptığı çalışmada MS (Gamborg's vitaminleri ile desteklenmiş Murashige ve Skoog besi ortamı), WP (temel tuzlarla desteklenmiş McCown's Woody plant), SH (Schenk ve Hildebrandt besi ortamı), G-5 (Gamborg's B-5) ve A (temel Rhodendron tuzları ile desteklenmiş Anderson's Rhodendron besi ortamı) 5 farklı besi ortamını test etmiştir. 5 farklı besi ortamı arasında ortalama sürgün uzunluğu ve ortalama sürgün sayısı bakımından önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Sürgün uçlarını kültüre aldıktan 30 gün sonra gözlemlemiş ve sağlıklı sürgünlerin boyu ve sayısı bakımından en iyi cevabı MS besi ortamı ile elde ederken, en zayıf sonuçları A besi ortamından elde etmiştir. Eksplantlardaki kallus oluşumu bakımından besi ortamları kıyaslandığında %65 ortalama ile SH besi ortamı olurken en düşük sonuçları G-5 besi ortamından %20 olarak sonuç elde etmiştir. Sürgün ucu nekrozu bakımından en az nekroz oluşturan ortam G-5 besi ortamı olmuştur. Yapılan çalışma genel olarak değerlendirildiğinde *P. vera* L. için en iyi proliferasyon ortamının MS besi ortamı olduğu rapor edilmiştir.

Sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu üzerine yapılan bir çok çalışmada sitokinin ve oksinleride içeren farklı BBD'nin etkileri üzerine odaklanırken, genellikle MS besi

ortamı kullanıldığı bildirilmiştir (**Bell ve ark. 2009**). Sürgünlerin çoğaltılma koşullarının optimizasyonu için, bitki türlerinin özel gereksinimleri sadece MS değil SH ve WPM gibi diğer besi ortamları ile de test edilmelidir. Sakız ağacı ile ilgili olarak MS ve WPM besi ortamı için çelişkili sonuçlar rapor edilmesine rağmen (**Fascella ve ark. 2004; Mascarello ve ark. 2007**); **Yıldırım** (**2012**), tohumdan gelişen sakız ağacı sürgünlerinin mikroçoğaltımı üzerine yapılan çalışmada 1 mgl^{-1} BA ile desteklenmiş MS, DKW, QL ve WPM besi ortamlarının sürgün proliferasyonuna etkisi araştırılmış ve sakız ağacı proliferasyonu için en uygun besi ortamının MS olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile sakız ağacı sürgünlerinin proliferasyonu için rapor edilen çelişkili sonuçlara bir son konulmuştur.

Delijam ve ark. (**2016**), *Pistacia vera* cv. Ghazvini için bütünleşmiş bir mikropropagasyon aşamalarının tanımlandığı çalışmada; GNH (Garoosi, Nezami ve Haddad) olarak adlandırdıkları yeni ve etkili bir besi ortamını, birkaç standart besi ortamına karşı denendi. Farklı vitaminler, kalsiyum kaynağı ve çeşitli BBD'leri *in vitro* sürgün üretimi ve köklenme uyarımı için kullanıldı. Sürgün gelişimi için MS, DKW ve WPM besi ortamlarına karşı ile GNH besi ortamı kullanıldığında 4.25 ± 0.25 ortalama sürgün sayısı ve 69.87 ± 9.19 mm uzama ile önemli bir sonuç elde edildi. Sürgün mikroçoğaltımı için optimum kalsiyum ve vitamin konsantrasyonu 3.0 mM Ca glukonat ve DKW vitaminleri olduğunu bildirildi. GNH besi ortamı için optimum BBD ve konsantrasyonu ise 0.5 ve/veya 1.0 mgl^{-1} BAP ve 0.1 mgl^{-1} IBA olduğu bildirildi. En yüksek köklenme paremetreleri 2.0 mgl^{-1} NAA içeren GNH besi ortamına 3.0 mM Ca glukonat ya da Fe-EDDHA (0.2 mM Fe) eklenmesiyle elde edilmiştir. Serada aklimatize edilen bitkilerin yaklaşık %70'i hayatta kalmıştır.

4.6.2. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Kuvvetlerinin Etkisi

Rejenere edilen sürgünlerin proliferasyonuna bir önceki deneyde belirlediğimiz en iyi besi ortam tipi olan MS besi ortamının 1/4, 1/2, 1/1, 2 kuvvetlerinin etkisi araştırıldı. Besi ortamı 30 gl^{-1} sukroz, 6.5 mgl^{-1} agar ve 1 mgl^{-1} BA ile desteklendi. Dört haftalık kültür dönemi sonunda test edilen parametreler Çizelge 4.7.'de verildi.

Çizelge 4.7. MS besi ortamının farklı kuvvetlerinin sürgün proliferasyonuna etkisi *

Klonlar	Besi Ortamı Kuvveti (gl^{-1})	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu± SH (mm)
Klon-I	**1/4**	1.25 ± 0.12 c	9.61 ± 0.39 b
	1/2	1.65 ± 0.14 b	11.15 ± 0.58 b
	1/1	1.95 ± 0.10 b	12.70 ± 0.41 b
	2	2.60 ± 0.09 a	17.75 ± 0.19 a
Klon-II	**1/4**	1.10 ± 0.17 c	10.22 ± 1.53 b
	1/2	1.65 ± 0.10 b	12.80 ± 1.19 b
	1/1	1,90 ± 0.11 a	14.25 ± 1.18 a
	2	1.60 ± 0.11 b	11.60 ± 0.11 b
Klon-III	**1/4**	1.10 ± 0.24 b	9.24 ± 0.71 b
	1/2	1.25 ± 0.19 b	12.54 ± 0.39 a
	1/1	1.65 ± 0.90 a	14.47 ± 0.50 a
	2	1.40 ± 0.11 ab	9.60 ± 0.11 b

**Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 20.*

Besi ortamı kuvvetleri; ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunu istatistiki olarak önemli derecede etkilemiştir ($P < 0.05$). Klonları kendi arasında değerlendirdiğimiz zaman *Klon-I*'e baktığımızda MS'in kuvvetleri arasında sürgün sayısı bakımından en iyi oranı 2 MS uygulamasında 2.60 olarak elde edildi. MS'in kuvveti düştükçe sürgün sayısında da paralel olarak düşmenin olduğu açıkça görülmektedir. 2 MS uygulaması sürgün sayısı bakımından en iyi sonucu verirken aynı zamanda sürgün uzunluğu bakımından da en iyi ortamı sağlamış ve ortalama 17.75 mm uzunluğa ulaşan sürgünler elde edilmiştir. *Klon-II* de ise en iyi MS kuvvetinin 1/1 olduğu görüldü. Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu olarak sırasıyla 1.90 ve 14.25 mm değerleri ölçüldü. En düşük ortalama sürgün sayısı 1/4 MS uygulaması ile elde edildi. En küçük sürgün uzunluğuna ise aynı kuvvette 10.22 mm olarak ölçüldü. *Klon-III* için en iyi MS kuvvetinin 1/1 uygulama ile elde edildiği ve ortalama sürgün sayısı 1.65 olarak ölçüldü. Sürgün uzunluğu ise 14.47 mm olarak belirlendi. Bundan sonra yapılan deneylerde *Klon-I* için 2 MS ve *Klon-II* ve *Klon-III* için MS 1/1 kuvveti kullanıldı.

4.6.3. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Aminoasitlerin Etkisi

Klon-I, Klon-II ve *Klon-III* genotiplerinin standart MS besi ortamına (1 mgl^{-1} BA, 30 gl^{-1} sukroz ve 6.5 gl^{-1} agar) 50 mgl^{-1} olacak şekilde 5 farklı aminoasit; valin, triptofan, metiyonin, alanin ve lösin ile bir kontrol grubu şeklinde 6 kombinasyonlu besi

ortamında test edildiler. Dört haftalık kültür dönemi sonunda test edilen parametreler ölçülerek elde edilen veriler Çizelge 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.16. *Klon-I* genotipinin 50 mgl^{-1} aminoasit içeren MS besi ortamına aktarılan sürgün uçları: **a)** Valin destekli ortamdaki sürgünlerin gelişmesi (Bar: 16 mm), **b)** Lösin destekli sürgünlerin gelişimesi (Bar: 16 mm), **c)** Alanin destekli MS ortamdaki sürgünlerin gelişmesi (Bar: 7 mm)

Yapılan gözlemler sonucunda gelişmeye bırakılan *Klon-I*'e ait sürgün uçlarının iyi bir gelişme gösterdiği ve prolifere olan sürgünlerin oldukça canlı görünümlü, parlak yeşil renkli yaprakların olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.8.'de görüldüğü gibi, uygulanan işlemler arasında çok önemli istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır. 28 günlük kültür sonucunda ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi ortamın kontrol ve valinin olduğu görülmüştür ve her iki ortamda sürgün sayısı %2.35 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16.a., 4.16.b., 4.16.c.). Ortalama sürgün sayısı bakımından %1.60 ile en düşük değerin metiyonin grubunda olduğu görülmüştür.

Ortalama sürgün uzunluğu bakımından 19.11 mm ile en iyi modifiye ortam valin ilave edilmiş besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. Valin ile destekli besi ortamında sürgünler muazzam bir şekilde gelişmiştir. Hem fidelerin sürgün uzunluğu hem de nod sayısı bakımından aynı zamanda kalın bir gövde yapısına da ulaşmış durumdadır. Sürgün uzunlukları arasında çok önemli farklılıklar görülmemiştir. Diğer ortamlar içinde en küçük sürgün uzunluğu 13.22 mm ile lösin destekli besi ortamı olmuştur.

Genellikle *Klon-I* genotipinde sürgünler çok sayıda yaprak oluşturmuşlardır. Bu genotiplerin melez olması bakımından sürgünlerin gelişimi açısından ölçülen özelliklerin diğer yabani genotiplere göre biraz daha gelişimin yavaş ve zayıf olduğunu göz önünde bulundurmamız gerekir. Nod sayısı bakımından en iyi ortam 9.62 değeriyle valin grubunda ölçülmüştür. Nod sayısı bakımdan en zayıf nod oluşumu alanin ilaveli ortam ile %7.78 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16.a., 4.16.b., 4.16.c., 4.16.d.). *Klon-I* genotipinde uç kararması genellikle pek gözlemlenmemiştir. En yüksek uç kararmasının valinli grupta olduğu belirlenmiştir. En düşük uç kararması ise metiyonin bulunan ortamda olduğu belirlenmiştir. Çalışılan 3 melez genotip içinde aminoasitli MS besi ortamına olumlu yönde cevap veren *Klon-I* olmuştur. Kallus oluşturma oranlarına çizelgede yer verilmemiştir çünkü bütün materyaller %100 kallus oluşturmuşlardır.

Çizelge 4.8. Sürgün proliferasyonuna farklı aminoasitlerin etkisi*

Klonlar	Aminoasitler	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı	Uç Kararması (%)
Klon-I	**Kontrol**	2.35 ± 0.20 a	16.60 ± 1.54 ab	8.42 ± 0.27 b	12.77 ± 0.04 bc
	Valin	2.35 ± 0.13 a	19.11 ± 1.03 a	9.62 ± 0.37 ab	28.57 ± 0.06 ab
	Triptofan	1.90 ± 0.16 ab	14.94 ± 1.53 ab	9.15 ± 0.52 b	9.09 ± 0.05 c
	Alanin	2.40 ± 0.19 ab	15.57 ± 1.06 ab	7.78 ± 0.31 c	7.14 ± 0.03 c
	Metiyonin	1.60 ± 0.10 b	18.24 ± 1.82 a	9.63 ± 0.57 a	6.06 ± 0.04 c
	Lösin	2.15 ± 0.24 a	13.22 ± 1.18 b	9.27 ± 0.40 b	16.28 ± 0.05 b
		-	**P = 0.006 < 0.05**	**-**	**P = 0.001 < 0.05**
Klon-II	**Kontrol**	2.05 ± 0.21 a	21.08 ± 1.56 a	7.46 ± 0.42 c	17.07 ± 0.05 bc
	Valin	1.40 ± 0.11 ab	14.76 ± 1.11 b	9.10 ± 0.42 b	50.00 ± 0.96 ab
	Triptofan	1.95 ± 0.15 a	15.41 ± 1.41 b	8.46 ± 0.43 b	25.64 ± 0.70 bc
	Alanin	1.90 ± 0.26 a	16.88 ± 1.40 ab	9.10 ± 0.42 b	26.32 ± 0.72 bc
	Metiyonin	1.65 ± 0.10 ab	11.21 ± 0.71 c	8.06 ± 0.48 b	66.67 ± 0.83 a
	Lösin	1.40 ± 0.11 ab	11.38 ± 0.46 c	9.21 ± 0.34 b	32.14 ± 0.89 bc
		-	**-**	**-**	**-**
Klon-III	**Kontrol**	1.05 ± 0.05 c	11.18 ± 0.25 b	8.76 ± 0.56 ab	0.00 ± 0.00 c
	Valin	1.25 ± 0.09 bc	10.85 ± 0.51 ab	7.92 ± 0.45 bc	16.00 ± 0.74 ab
	Triptofan	1.55 ± 0.11 ab	11.88 ± 0.29 a	9.74 ± 0.39 a	0.00 ± 0.00 b
	Alanin	1.55 ± 0.15 ab	10.02 ± 0.42 bc	8.45 ± 0.42 bc	0.00 ± 0.00 b
	Metiyonin	1.15 ± 0.81 c	10.91 ± 0.26 ab	7.30 ± 0.26 c	13.04 ± 0.71 ab
	Lösin	1.75 ± 0.20 a	9.49 ± 0.53 c	8.28 ± 0.44 bc	5.71 ± 0.39 b
		P = 0.001 < 0.05	**P = 0.006 < 0.05**	**P = 0.002 < 0.05**	**P = 0.002 < 0.05**

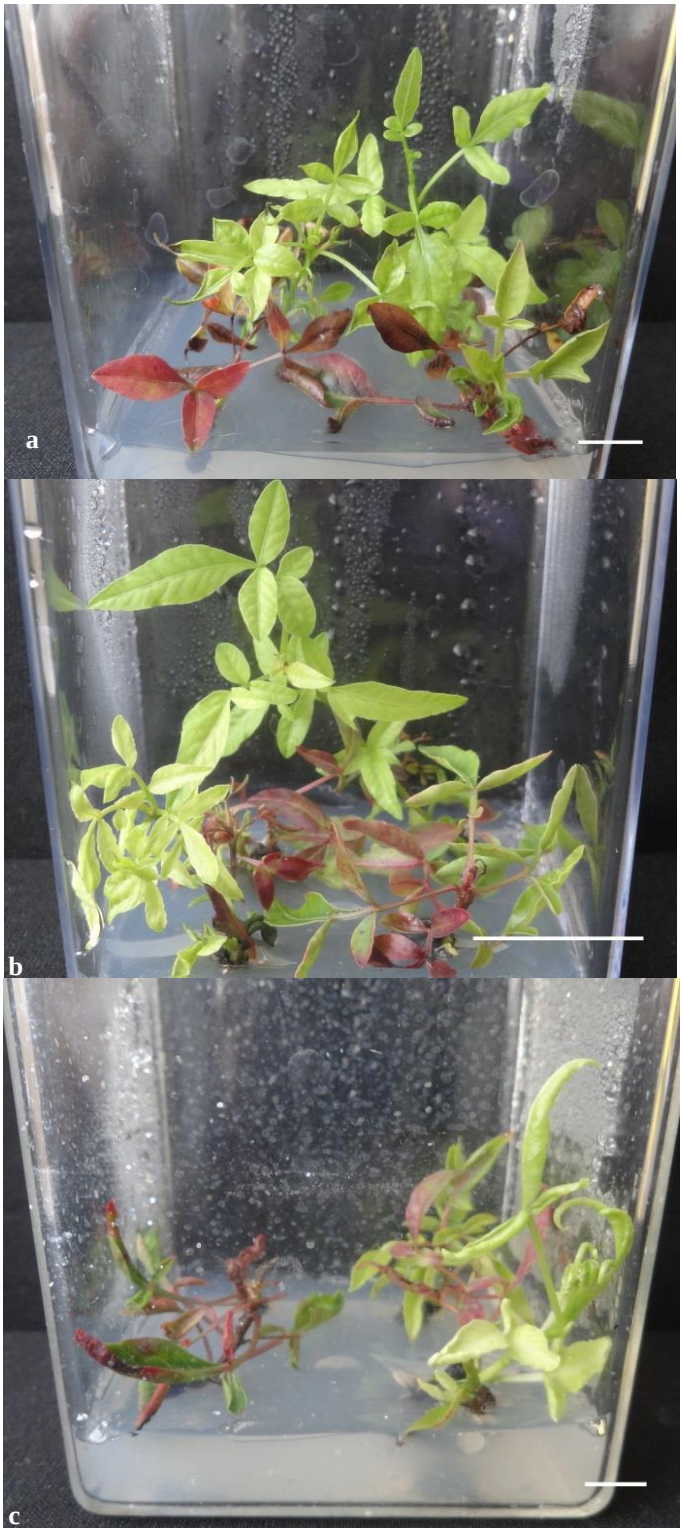
Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 sürgün ucu ortalamasıdır.

Klon-II genotipinde yapılan gözlemler sonucunda yeni sürgün oluşturma potansiyellerinin aminoasitli ortamlarda çok yüksek olmadığı fakat bunun yanında yeni oluşan sürgünlerin oldukça canlı ve kaliteli olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.8.'de ifade edildiği gibi, uygulanan işlemler arasında çok önemli istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır. 28 günlük kültür sonucunda ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi ortamın kontrol, triptofan ile alanin ilaveli besi ortamı olduğu görülmüş ve sırasıyla %2.05, %1.95 ve %1.90 olarak ölçülmüştür. Ortalama sürgün sayısı bakımından %1.40 ile en düşük ölçümün alanin ve valin grubunda olduğu görülmüştür. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından 21.08 mm ile en iyi modifiye ortamın kontrol grubu olduğu tespit edilmiştir. Sürgün uzunlukları arasında çok önemli farklılıklar görülmedi. Diğer ortamlar içinde en kısa sürgün uzunluğu 11.21 mm ile metiyoninli destekli besi ortamı olmuştur. Bu genotiplerin melez olması bakımından sürgünlerin gelişimi acısından ölçülen özelliklerin diğer genotiplere göre biraz daha gelişimlerinin yavaş ve zayıf olduğunu göz önünde bulundurmamız gerekir. Nod sayısı bakımından en iyi ortam valin ve alanin 9.10 değeriyle ölçülmüştür. Nod sayısı bakımdan en zayıf nod oluşumu metiyonin ilaveli ortam ile 7.46 olarak ölçülmüştür. *Klon-II* genotipinde uç yanması genellikle diğer iki genotiple kıyasla daha fazla görülmektedir. En yüksek uç kararması

metiyonin grubunda olduğu ölçülmüştür. En düşük uç kararması ise metiyonin grubunda olduğu belirlenmiştir. Yapılan aminoasit uygulamalarına genel olarak bakıldığında gözlemlenen özellikler bakımından *Klon-II* klonu için en iyi ortamların birbirine yakın değerlerle kontrol, alanin ve triptofan ilave edilmiş standart MS besi ortamının olduğu görülmüştür (Şekil 4.17.a., 4.17.b., 4.17.c.). Kallus oluşturma oranlarına çizelgede yer verilmemiştir çünkü bütün materyaller %100 kallus oluşturmuşlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda *Klon-II* için kontrol grubu (1 mgl^{-1} BA) kullanılmıştır.

Klon-III genotipinde yapılan gözlemler sonucunda yeni sürgün oluşturma potansiyellerinin aminoasitli ortamlarda çok yüksek olmadığı fakat bunun yanında yeni oluşan sürgünlerin oldukça canlı ve kaliteli olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.8.'de görüldüğü gibi, uygulanan işlemler arasında çok önemli istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır. 28 günlük kültür sonucunda ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi ortamın triptofan ile alanin ilaveli ortam olduğu görülmüş ve sırasıyla %1.55 olarak ölçülmüştür.

Ortalama sürgün sayısı bakımından %1.05 ile hemen hemen hiç yeni sürgün oluşturmayarak en düşük ölçümün kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından 11.88 mm ile en iyi modifiye ortamın triptofan ve 11.08 ile kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Sürgün uzunlukları arasında çok önemli farklılıklar olmamasına rağmen diğer ortamlar içinde en küçük sürgün uzunluğu 9.49 mm ile lösin ilaveli ortam olmuştur. Nod sayısı bakımından en iyi ortam 9.74 değeriyle triptofan grubunda ölçülmüştür. Nod sayısı bakımdan en zayıf nod oluşumu metiyoninli ortam ile 7.30 olarak ölçülmüştür. En yüksek uç kararması valinli grupta olduğu gözlenmiştir. En düşük uç kararması ise kontrol, triptofan ile alanin uygulamalarında olduğu belirlenmiştir. *Klon-III* genotipi için daha sonraki çalışmalarda genel olarak sürgün gelişimine en iyi ortam olarak belirlenen triptofan kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.17. a) *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonunun 28 gün sonunda triptofan aminoasitli ortamadaki gelişim durumu (Bar: 8 mm), **b)** 28 gün sonunda alanin aminoasitli ortamdaki sürgünlerin gelişim durumu (Bar: 9.8 mm), **c)** 28 gün sonunda valin aminoasitli ortamdaki sürgünlerin gelişim durumu (Bar: 4.57 mm)

4.6.4. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Karbonhidrat Çeşitlerinin Etkisi

Bu deneyde, *in vitro* rejenerantların proliferasyonuna sukroz, fruktoz, glikoz ve laktoz gibi farklı şeker çeşitlerinin etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı karbonhidrat çeşitlerinin sürgün proliferasyonuna etkisi *

Klonlar	Şeker Çeşidi	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Uç Karaması ± SH (%)
Klon-I	**Kontrol**	1.05 ± 0.05 b	13.24 ± 0.62 c	8.66 ± 0.60 b	14.29 ± 0.07 c
	Laktoz	1.90 ± 0.14 ab	17.55 ± 0.05 b	8.75 ± 0.14 a	7.33 ± 0.04 b
	Fruktoz	1.80 ± 0.18 ab	19.80 ± 0.05 ab	8.43 ± 0.11 b	10.75 ± 1.05 a
	Glikoz	1.85 ± 0.15 ab	20.01 ± 0.14 ab	8.71 ± 0.05 b	8.71 ± 0.05 b
	Sukroz	2.15 ± 0.05 a	25.04 ± 0.05 a	12.35 ± 0.47 a	1.55 ± 0.42 c
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-II	**Kontrol**	1.45 ± 0.11 b	12.48 ± 0.47 b	8.62 ± 0.04 b	34.48 ± 0.14 a
	Laktoz	1.45 ± 0.11 b	16.51 ± 1.19 ab	6.81 ± 0.03 b	9.42 ± 0.11 b
	Fruktoz	1.05 ± 0.13 c	10.48 ± 0.14 b	6.05 ± 0.10 b	10.75 ± 1.05 ab
	Glikoz	1.50 ± 0.47 ab	15.75 ± 0.04 b	8.40 ± 0.14 b	10.81 ± 0.11 ab
	Sukroz	1.65 ± 0.04 a	18.21 ± 0.14 a	10.00 ± 0.04 a	12.00 ± 0.51 a
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-III	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 b	12.50 ± 0.37 b	11.00 ± 0.55 a	0.00 ± 0.00 c
	Laktoz	1.60 ± 0.14 ab	14.55 ± 0.14 b	4.53 ± 1.15 c	16.00 ± 0.83 b
	Fruktoz	1.25 ± 0.10 b	11.25 ± 0.18 b	6.00 ± 1.15 b	15.84 ± 0.17 b
	Glikoz	1.45 ± 0.11 b	15.65 ± 0.62 b	6.80 ± 0.11 b	20.15 ± 0.43 b
	Sukroz	1.80 ± 0.04 a	19.43 ± 0.14 a	8.28 ± 0.11 ab	33.75 ± 0.01 a
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

Rakamlar kültürün 28. gününde her paremetreden toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

4 haftalık kültür dönemi sonucunda alınan verilere göre, farklı şeker tipleriyle desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, nod sayısı ve uç kararması test edilen işlem grupları *Duncan* testiyle karşılaştırıldığında meydana gelen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.9.).

Yapılan gözlemler sonucunda gelişmeye bırakılan *Klon-I*'e ait sukroz ile karbonhidrat kaynağı sağlanmış sürgün uçlarının iyi bir gelişme gösterdiği ve elde edilen sürgünlerin oldukça canlı görünümlü, parlak yeşil renkli yaprakların olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi, uygulanan işlemler arasında çok önemli istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır. 28 günlük kültür sonucunda ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi ortamın sukroz olduğu görülmüş ve %2.15 olarak ölçülmüştür. Ortalama sürgün sayısı bakımından %1.05 ile neredeyse hiçbir yeni sürgün oluşturmayarak en düşük ölçümün kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Ortalama

sürgün uzunluğu bakımından 25.04 mm ile en iyi ortamın sukroz ilave edilmiş besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. Sukroz ortamında sürgünlerin gelişimi muazzam bir şekilde gelişme göstermiştir. Hem fidelerin sürgün uzunluğu hem de nod sayısı bakımından aynı zamanda kalın bir gövde yapısına da ulaşmış durumdadır. Sürgün uzunlukları arasında sukroz ve kontrol grubu arasında çok önemli farklılıklar görülürken sukroz ve diğer şeker grupları arasında aşırı önemli farklar görülmemiştir. Diğer ortamlar içinde en kısa sürgün uzunluğu 13.24 mm ile kontrol grubu olmuştur. Genellikle *Klon-I* genotipinde sürgünler çok sayıda yaprak oluşturur. Nod sayısı bakımından en iyi ortam %12.35 değeriyle sukroz grubunda ölçülmüştür. Nod sayısı bakımdan en zayıf nod oluşumu kontrol grubu ile %8.66 olarak ölçülmüştür. *Klon-I* genotipinde uç kararması genellikle pek gözlemlenmez. En yüksek uç kararması fruktoz grubunda olduğu ölçülmüştür. En düşük uç kararması ise kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. Bütün test ortamlarında sürgünler kallus oluşturduğu için bu değer çizelgeye eklenmemiştir. Hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu ve morfolojik gözlemler yönünden sukroz seker tipinin sürgünlerinin çok kaliteli olduğu ve altkültüre alınabilir özelliklerinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.9.'da ifade edildiği gibi, uygulanan işlemler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmamaktadır. 28 günlük kültür sonucunda ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi ortamın sukroz olduğu görülmüştür ve 1.65 olarak ölçülmüştür. Kontrol ve maltoz grubu da en iyi sürgün oluşturan ortamlar olarak sukrozdan çok az bir farkla 1.45 oranla ikinci sırayı almışlardır. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından en iyi oranı 18.21 mm ile sukroz grubu olduğu görülmüştür. Sürgün uzunlukları arasında çok önemli farklılık olmamakla birlikte, laktoz ve glikoz iyi sonuç veren ortamlar olmuştur. Diğer ortamlar içinde en kısa sürgün uzunluğu 10.48 mm ile fruktoz olmuştur. Nod sayısı bakımından en iyi ortam 10 değeriyle sukroz grubunda ölçülmüştür. Nod sayısı bakımdan en az nod oluşumu fruktoz ile 6.05 olarak ölçülmüştür. Yapılan morfolojik gözlemlere bakıldığında altkültüre alınabilirlik bakımından en iyi ortamın sukroz olduğu belirlenmiştir. Kültürler 6. haftasında bile canlılığını korumuş herhangi bir sararma ve kararma gözlenmemiştir.

Klon-III genotipinde test edilen dört farklı karbohidrat çeşidi arasından sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, nod sayısı ve uç kararması bakımından en iyi sonuç alınan ortam sukroz olmuştur. *İn vitro* sürgün çoğaltılması çalışmalarında kullanılmak üzere

seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda MS besi ortamının bu karbonhidrat çeşidi ile desteklenmesine karar verilmiştir.

4.6.5. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Sürgün proliferasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere MS besi ortamında kullanılacak sukroz konsantrasyonunu optimize etmek için, altkültürlerden elde edilen sürgün uçları, dört farklı sukroz konsantrasyonunda (%2, %3, %4, %6) bir kontrol grubu ile birlikte 1 mgl^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alınarak test edildi. 4 haftalık kültür dönemi sonucunda elde edilen verilerin analizlerine göre; farklı sukroz oranlarıyla desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan oluşan sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, nod sayısı ve uç kararması bakımından test edilen işlem grupları *Duncan* testiyle karşılaştırıldığında, farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). Veriler Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

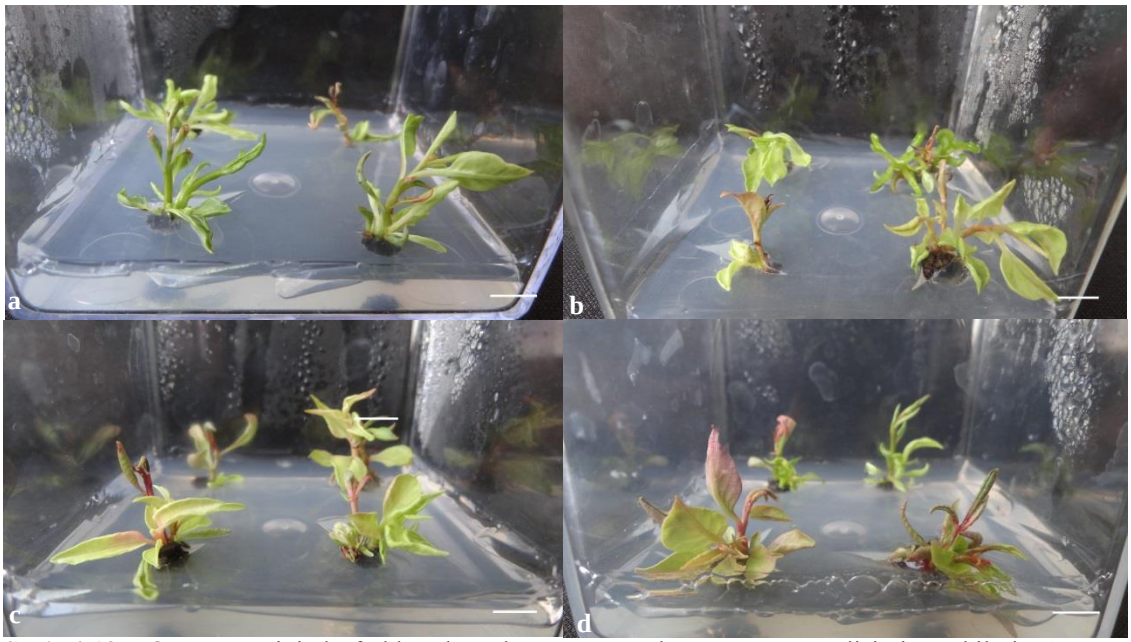
Çizelge 4.10. Sürgün proliferasyonuna sukrozun farklı konsantrasyonlarının etkisi*

Klonlar	Sukroz (%)	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Uç Kararması ± SH (%)
Klon-I	**Kontrol**	1.05 ± 0.05 c	13.24 ± 0.62 ab	8.66 ± 0.60 a	0.34 ± 0.14 a
	2	2.25 ± 0.17 b	13.51 ± 0.60 a	7.78 ± 0.19 b	0.10 ± 0.04 b
	3	2.60 ± 0.21 ab	13.24 ± 0.43 ab	9.07 ± 0.19 a	0.03 ± 0.02 b
	4	2.47 ± 0.17 ab	11.27 ± 0.49 b	8.31 ± 0.24 ab	0.05 ± 0.03 b
	6	2.75 ± 0.14 a	11.69 ± 0.46 b	6.90 ± 0.15 c	0.00 ± 0.00 b
		P = 0.003 < 0.05	-	**P = 0.003 < 0.05**	-
Klon-II	**Kontrol**	1.45 ± 0.11 c	12.48 ± 0.47 b	8.62 ± 0.43 a	0.34 ± 0.14 c
	2	2.00 ± 0.27 b	20.34 ± 1.46 a	8.10 ± 0.33 a	9.42 ± 0.11 b
	3	3.00 ± 0.00 a	19.82 ± 1.29 a	8.30 ± 0.24 a	10.75 ± 1.05 ab
	4	1.85 ± 0.15 bc	17.80 ± 1.29 a	7.08 ± 0.19 b	10.81 ± 0.11 ab
	6	1.95 ± 0.11 b	19.08 ± 1.14 a	6.76 ± 0.15 b	12.00 ± 0.51 a
		P = 0.001 < 0.05	-	**P = 0.001 < 0.05**	-
Klon-III	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 c	12.50 ± 0.37 d	7.80 ± 0.17 b	0.00 ± 0.00
	2	1.70 ± 0.17 b	14.13 ± 0.69 cd	6.88 ± 0.29 c	0.00 ± 0.00
	3	3.05 ± 0.29 a	18.95 ± 0.53 a	11.00 ± 0.55 a	0.00 ± 0.00
	4	2.00 ± 0.17 b	15.96 ± 0.66 b	6.55 ± 0.15 c	0.00 ± 0.00
	6	2.25 ± 0.17 b	15.80 ± 0.26 bc	7.05 ± 0.15 c	0.00 ± 0.00
		-	-	-	-

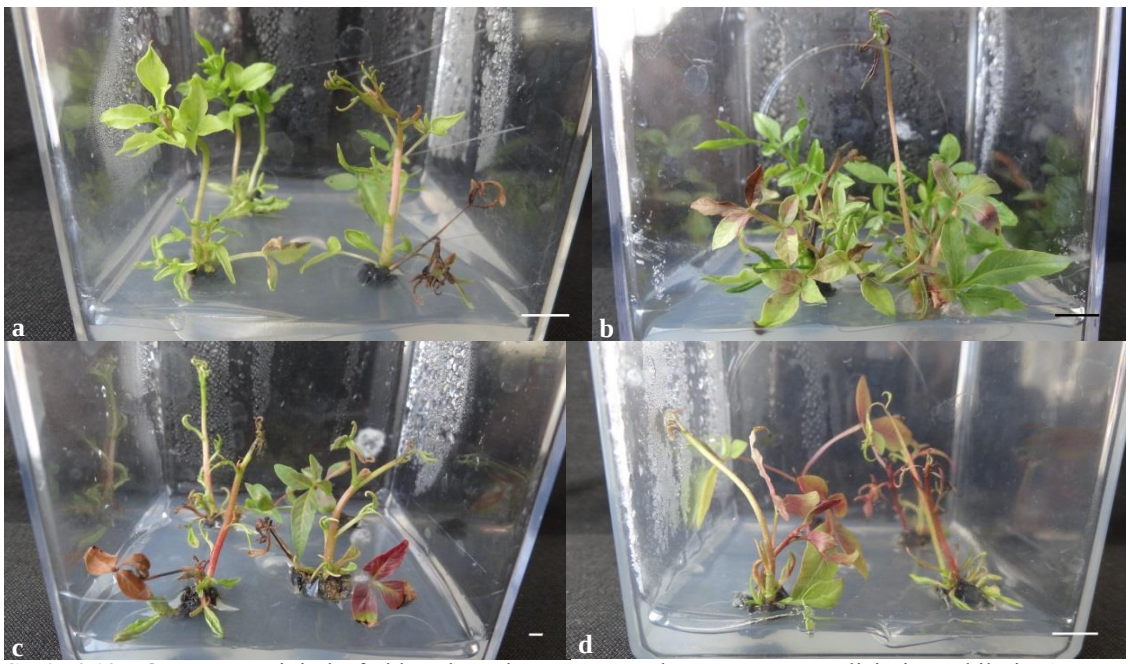
Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplant ortalamasıdır.

Klon-I için sukrozun denenen konsantrasyonlarında sürgün sayısı ve nod sayısı bakımından en iyi sonucun sırasıyla ortalama 2.60, 9.07 ile %3 sukroz ile desteklenen MS besi ortamından alındığı tespit edildi. Sürgün uzunlukları bakımından değerlendirildiğinde kontrol, %2 ve %3 birbirine çok yakın sonuçlar vermiştir. Fakat

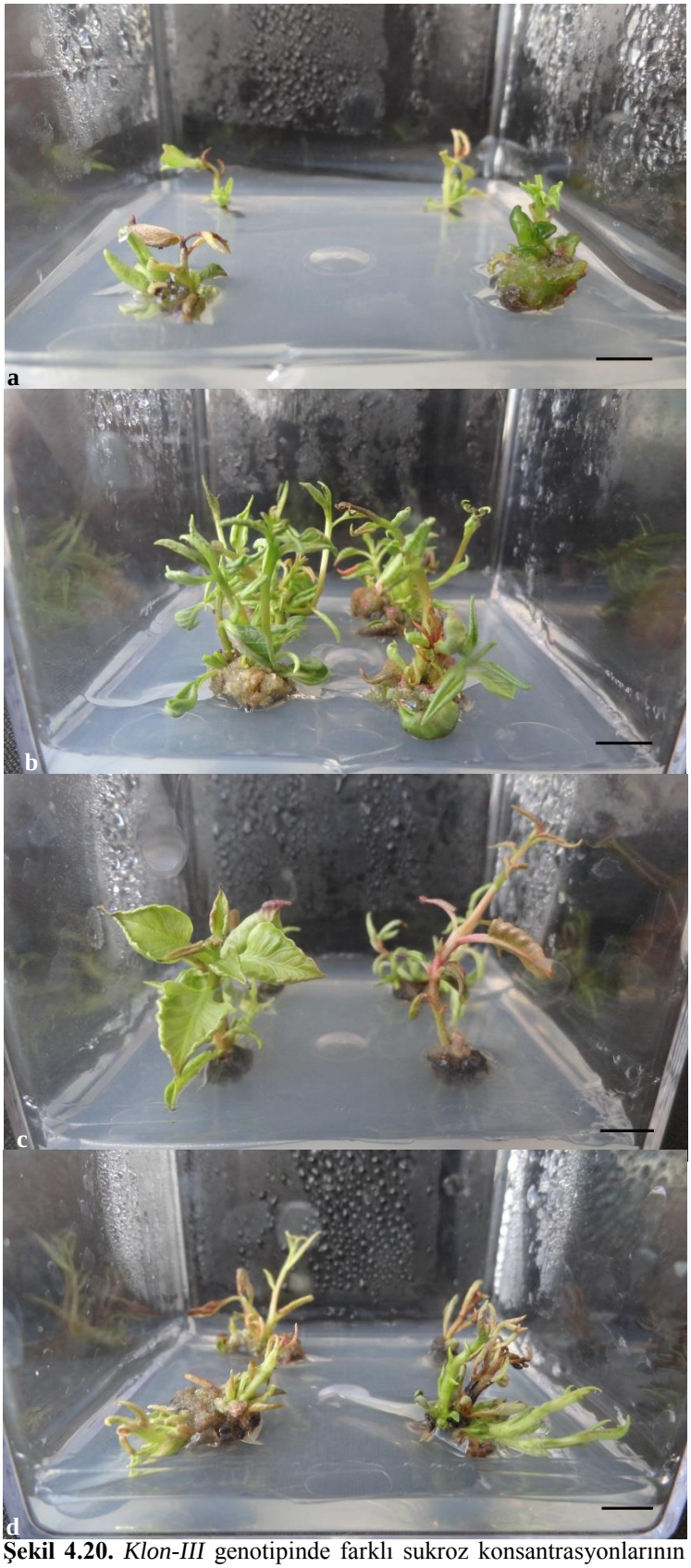
diğer özellikler göz önünde bulundurulup bir bütün olarak değerlendirildiğinde sürgün proliferasyonuna en uygun ortamın %3 konsantrasyonda kullanılan sukrozun olduğu açıkça görülmektedir. Bütün eksplantlarda kallus oluşumu görülmüştür (Şekil 4.18.a., 4.18.b., 4.18.c., 4.18.d.).



Şekil 4.18. *Klon-I* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz (Bar: 3.43 mm), **b)** 30 g sukroz (Bar: 5 mm), **c)** 40 g sukroz (Bar: 6 mm), **d)** 60 g sukroz (Bar: 4.46 mm)



Şekil 4.19 *Klon-II* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz (Bar: 22 mm), **b)** 30 g sukroz (Bar: 6 mm), **c)** 40 g sukroz (Bar: 4.72 mm), **d)** 60 g sukroz (Bar: 8 mm)



Şekil 4.20. *Klon-III* genotipinde farklı sukroz konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** 20 g sukroz (Bar: 6 mm), **b)** 30 g sukroz (Bar: 13 mm), **c)** 40 g sukroz (Bar: 6 mm), **d)** 60 g sukroz (Bar: 5 mm)

Klon-II için sukrozun denenen konsantrasyonlarında sürgün sayısı bakımından en iyi sonucun ortalama 3 ile %3 sukrozla desteklenen MS besi ortamından alınmıştır. Sürgün uzunlukları bakımından değerlendirildiğinde %2, %3 ve %6 birbirine çok yakın sonuçlar vermiştir. En uzun sürgün %2 sukroz ile desteklenen ortamdan alınmıştır. %6 sukroz konsantrasyonunda hiçbir eksplant da uç kararmasına rastlanmamıştır. Bütün eksplantlarda kallus oluşumu görülmüştür. Fakat diğer özellikler göz önünde bulundurulup bir bütün olarak değerlendirildiğinde sürgün proliferasyonuna en uygun ortamın %3 konsantrasyonda kullanılan sukrozun olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.19.a., 4.19.b., 4.19.c., 4.19.d).

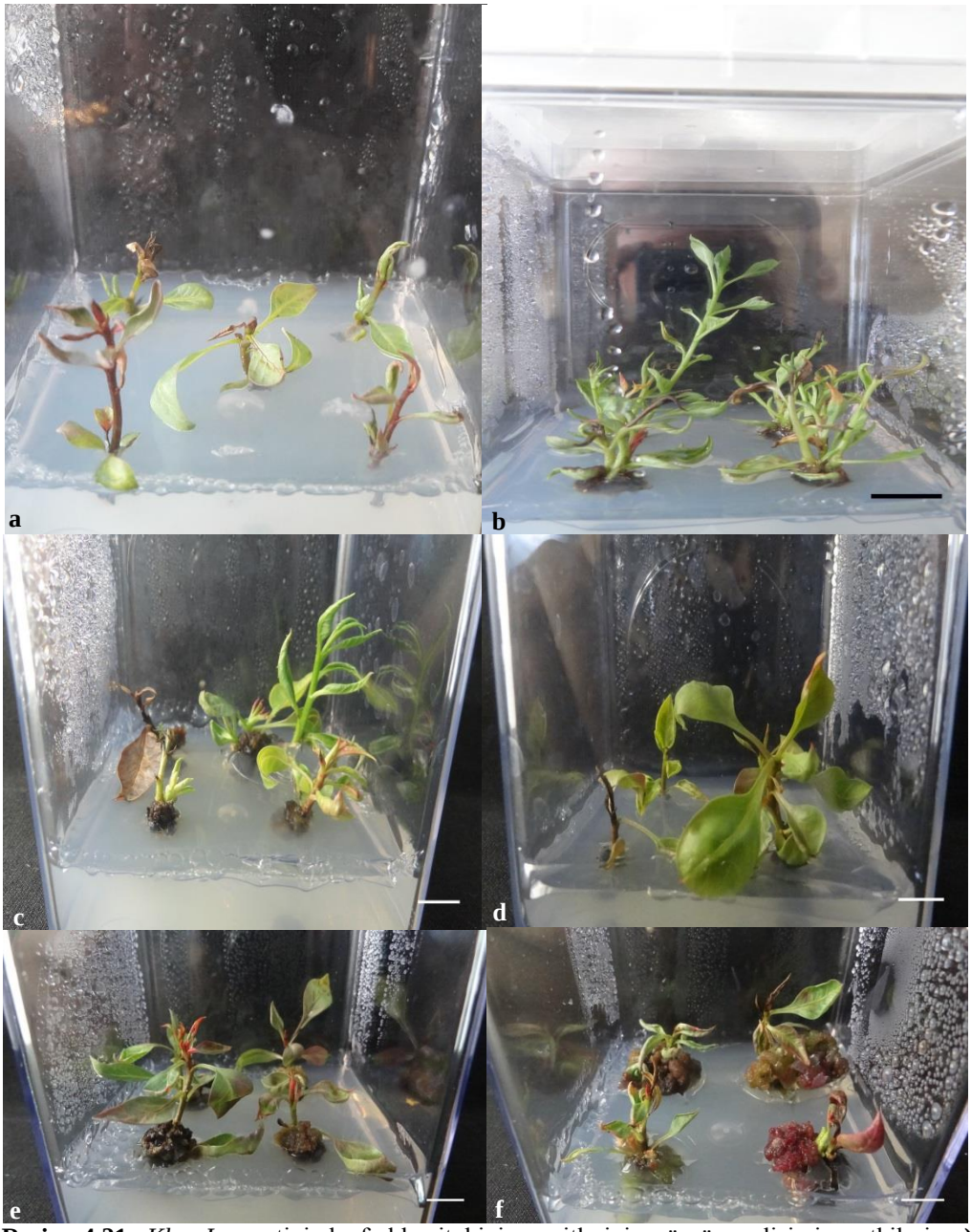
Klon-III için sukrozun test edilen konsantrasyonlarında sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı bakımından değerlendirildiğinde en iyi sonucun sırasıyla ortalama 3.05, 18.95 mm ve %11.00 oranı ile %3 sukroz ile desteklenen MS besi ortamından alınmıştır. Bütün eksplantlarda kallus oluşumu görülmüştür. Bütün eksplantlarda kallus oluşumu görülmüştür. *Klon-III* genotipinde sürgün proliferasyonuna en uygun ortamın %3 konsantrasyonda kullanılan sukrozun olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.20.a., 4.20.b., 4.20.c., 4.20.d.).

4.6.6. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokinin Çeşidinin Etkisi

Bitki büyüme düzenleyicilerin test edildiği bu deney gurubunda önceki deneyde en iyi besi ortamı olarak belirlenen MS besi ortamına 1 mgl^{-1} konsantrasyonlarda sitokinin (BA, Zeatin, Kinetin, TDZ ve 2iP) çeşitleri ilave edilerek bir kontrol grubuyla yapılan deneyin sonuçları Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Dört haftalık kültür dönemi sonucu elde edilen verilere göre; farklı sitokininlerle desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, nod sayısı, uç kararması ve kallus oluşturması bakımından sitokinin çeşitleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

Bu denemeler sonucunda *Klon-I* için elde ettiğimiz sonuçlara bakınca; eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı ölçümleri karşılaştırıldığında, en iyi sonucun 2.68 ile BA destekli besi ortamında olduğu aynı zamanda Zeatin 1.95 oranla yadsınamayacak bir sürgün oluşumu gösterdiği görülmüştür. Bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol gurubu ve geriye kalan diğer sitokinin çeşitlerinde sürgün oluşumu düşük

değerlerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.21.). Eksplantların ortalama sürgün uzunluğu karşılaştırıldığında en iyi sonucu BA destekli ortamda 19.69 mm olarak ölçülmüştür.



Resim 4.21. *Klon-I* genotipinde farklı sitokinin çeşitlerinin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 1 mgl^{-1} BA (Bar: 9 mm), **c)** 1 mgl^{-1} Zeatin (Bar: 6 mm), **d)** 1 mgl^{-1} Kinetin (Bar: 10 mm), **e)** 1 mgl^{-1} 2iP (Bar: 11 mm), **f)** 1 mgl^{-1} TDZ (Bar: 4.67 mm)

Klon-I genotipinde kallus oluşturan eksplant yüzdesi karşılaştırıldığında Zeatin, TDZ ve 2iP ortamlarında %100 kallus oluşumu mevcutken en az kallus oluşumu kinetin ortamından elde edilmiştir. Uç kararması en yüksek kontrol grubunda ortaya çıkmıştır.

Klon-I için sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en iyi ortam BA olarak belirlenmiştir. Yeni oluşan sürgünler canlı, parlak yeşil renkte olduğu gözlendi. İlk dikim uzunluğu 5-6 katına çıkan sürgünler olduğu ve 16 noda ulaşan sürgünler kaydedilmiştir. Yapılan morfolojik gözlemlere göre sürgün proliferasyonu bakımından BA'lı ortamdan sonra en iyi ortam zeatin olmuştur. Sürgün uçlarında hafif kızarmalar başlamış olsa bile sürgünler gayet parlak yeşil renkte ve canlı olarak gözlemlenmiştir. Kinetin ortamındaki sürgünlerin gelişimi değerlendirildiğinde en az kallus oluşumu bu deney setinde elde edilmiştir. Kinetin ortamında çok fazla proliferasyon görülmemesine karşın asıl sürgünde uzamalar ve nod sayısında artışlar görülmüştür. TDZ ortamında oluşan kalluslarda aşırı bir büyüme gözlemlendi. Sürgünler de herhangi bir proliferasyona rastlanmamış ve sürgünlerdeki boy uzaması genel olarak ilk dikim uzunluğunda kalmıştır. TDZ ortamından sonra en fazla kallus oluşumu 2iP ortamına görülmüştür. Sürgün proliferasyonu yok denecek kadar az miktarda, sürgün uçlarında kızarmalar başlamış, sürgünler canlılıklarını genel olarak korumuş olsa da solmalar başlamıştır.

Çizelge 4.11. Sürgün proliferasyonuna farklı sitokininlerin etkisi*

Klonlar	Sitokinin Çeşidi (%)	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Uç Kararması ± SH (%)	Kallus Oluşturan Eksplant ± SH (%)
Klon-I	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 c	17.32 ± 1.55 a	8.97 ± 0.51 b	30.00 ± 0.10 a	15.00 ± 0.08 c
	BA	2.68 ± 0.29 a	19.65 ± 0.68 a	10.70 ± 0.60 a	20.00 ± 0.06 ab	62.00 ± 0.08 b
	Zeatin	1.95 ± 0.15 b	11.67 ± 1.02 b	8.82 ± 0.38 b	7.69 ± 0.04 ab	100.0 ± 0.00 a
	Kinetin	1.65 ± 0.06 c	13.66 ± 1.01 b	9.27 ± 0.61 b	18.18 ± 0.08 ab	9.00 ± 0.06 c
	TDZ	1.50 ± 0.00 c	13.38 ± 0.28 b	6.60 ± 0.29 c	15.00 ± 0.08 ab	100.0 ± 0.00 a
	2iP	1.57 ± 0.05 c	11.07 ± 0.48 b	6.57 ± 0.24 c	4.76 ± 0.47 b	100.0 ± 0.00 a
s.d: 0.028 (F = 1.541)		**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.18 > 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-II	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 c	19.65 ± 0.71 a	10.80 ± 0.53 a	5.00 ± 0.05 a	65.00 ± 0.10 b
	BA	2.40 ± 0.18 a	17.86 ± 1.19 ab	8.41 ± 0.27 b	8.00 ± 0.04 a	100.0 ± 0.00 a
	Zeatin	1.65 ± 0.10 b	14.22 ± 1.52 bc	6.54 ± 0.41 c	6.00 ± 0.04 a	100.0 ± 0.00 a
	Kinetin	1.50 ± 0.00 c	14.17 ± 0.55 bc	5.80 ± 0.38 c	0.00 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a
	TDZ	1.50 ± 0.00 c	13.20 ± 0.90 c	5.60 ± 0.42 c	0.00 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a
	2iP	1.50 ± 0.00 c	12.87 ± 0.98 c	6.54 ± 0.41 c	0.00 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.42 > 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-III	**Kontrol**	1.05 ± 0.05 b	11.18 ± 0.25 bc	8.76 ± 0.56 a	0.00 ± 0.00	38.00 ± 0.10 b
	BA	3.20 ± 0.42 a	15.14 ± 0.72 a	6.71 ± 0.21 b	0.00 ± 0.00	100.0 ± 0.00 a
	Zeatin	1.15 ± 0.08 b	12.30 ± 0.70 b	6.08 ± 0.61 c	0.00 ± 0.00	100.0 ± 0.00 a
	Kinetin	1.50 ± 0.00 b	16.96 ± 1.13 a	8.10 ± 0.46 a	0.00 ± 0.00	100.0 ± 0.00 a
	TDZ	1.50 ± 0.00 b	9.23 ± 0.40 c	5.50 ± 0.28 c	0.00 ± 0.00	100.0 ± 0.00 a
	2iP	1.50 ± 0.00 b	12.61 ± 0.49 b	7.35 ± 0.40 ab	0.00 ± 0.00	100.0 ± 0.00 a
		-	-	-	-	**P = 0.00 < 0.05**

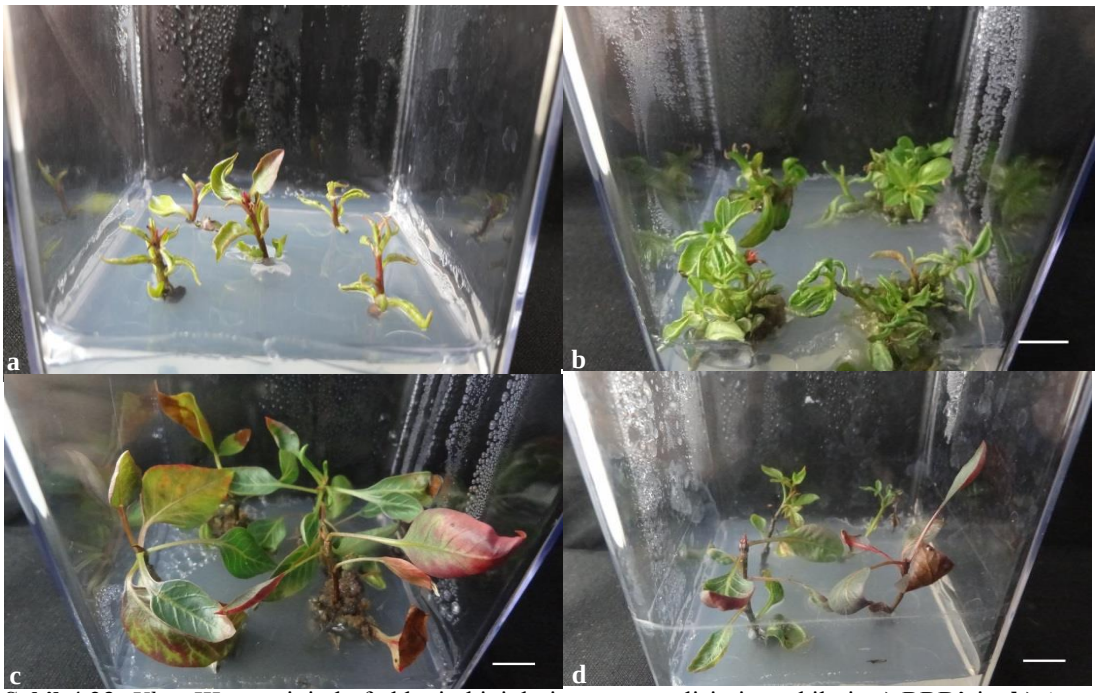
**Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 20*



Şekil 4.22. *Klon-II* genotipinde farklı sitokinin çeşitlerinin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 1 mgl^{-1} Kinetin (Bar: 22 mm), **c)** 1 mgl^{-1} Zeatin (Bar: 16mm), **d)** 1 mgl^{-1} BA (Bar: 3.8 mm) **e)** 1 mgl^{-1} TDZ (Bar: 2.6 mm), **f)** 1 mgl^{-1} 2iP (Bar: 11.87 mm)

Klon-II için bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri karşılaştırıldığında sürgün sayısı bakımından en iyi ortam 2.40 ile BA olmuştur. Kontrol, kinetin, TDZ ve 2iP ortamlarında herhangi bir proliferasyona rastlanmamıştır. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi uzama kontrol grubunda görüldü ve 19.65 mm olarak ölçüldü. Aynı zamanda en iyi nod sayısı 10.80 ile kontrol grubundan elde edildi.

Uç kararması kinetin, TDZ ve 2iP ortamlarında görülmezken; BA, Zeatin ve kontrol grubunda çok düşük miktarlarda görüldü. Kontrol grubu hariç diğer ortamlarda %100 kallus oluşumu görülmüştür. Yapılan morfolojik gözlemlere göre; sürgünler BA ortamında muazzam uzama göstermiş, uç yanması göz ardı edilecek kadar eser miktarda, sürgün uzunlukları ilk dikim uzunluğuna göre 4-5 katına kadar uzamış ve sürgünlerin morfolojik görünümleri zeatin ortamında gelişen sürgünlere benzer özellik taşıdığı gözlenmiştir. 2iP ve TDZ yeni sürgünler oluşturmamış olsalar dahi canlılıklarını korumaya devam etmişlerdir. *Klon-II* için BA sürgün uzunluğu ve nod sayısı açısından kontrol grubundan daha düşük oranlar vermiş olsa bile genel olarak oluşan sürgünlerin daha kaliteli ve parlak yeşil renkte olması bakımından BA ortamı en iyi sitokinin olarak seçilmiştir (Şekil 4.22.a., 4.22.b., 4.22.c., 4.22.d., 4.22.e., 4.22.f.).



Şekil 4.23. *Klon-III* genotipinde farklı sitokininlerin sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 1 mgl^{-1} BA (Bar: 10 mm), **c)** 1 mgl^{-1} 2iP (Bar: 11 mm), **d)** 1 mgl^{-1} Kinetin (Bar: 11 mm)

Klon-III için bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri karşılaştırıldığında sürgün sayısı bakımından en iyi ortam 3.20 ile BA sitokinini olmuştur (Şekil 4.23.a., 4.23.b., 4.23.c., 4.23.d.). Kinetin, TDZ ve 2iP ortamlarında herhangi bir proliferasyona rastlanmamıştır (Çizelge 4.11.). Sürgün uzunluğu bakımından en iyi uzama kinetin grubunda görüldü ve 16.96 mm olarak ölçüldü. En yüksek nod sayısına 8.76 ile kontrol

grubu ile ulaşıldı. Uç kararmasına kontrol grubu da dahil herhangi bir sitokinin ortamında rastlanmadı. Kontrol grubu hariç diğer ortamlarda %100 kallus oluşumu görülmüştür. 2iP ve TDZ ortamında sararmalar, kahverengileşmeler ve kallusların hacim olarak oldukça büyük oldukları görüldü. Sürgünler canlılıklarını koruyor olsalar bile solgun bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. *Klon-III* için Zeatin ve BA en uygun sitokininler olarak belirlenmiştir. Sürgünler parlak canlı renkli, yeni yapraklar oluşturma bakımından en iyi ortamlar olmuşlardır.

4.6.7. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Sitokinin Konsantrasyonunun Etkisi

Bu deney melez tohum kaynaklı eksplantların proliferasyonuna 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mgl^{-1} BA konsantrasyonlarının bir kontrol grubuyla birlikte etkisini belirlemek üzere yapılmıştır. Elde edilen verilere ait istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.12.'de verilmiştir. BA konsantrasyonlarının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, nod sayısı, uç kararması ve kallus oluşumu üzerine olan etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). *Klon-I* de bu çalışma için en fazla sürgünü 3.05 adet ile 2 mgl^{-1} BA uygulaması vermiştir. Kontrol grubunda ise proliferasyon elde edilmemiş ve sürgün sayısı 1.00 olarak gerçekleşmiştir. Ortalama sürgün uzunluğunda en yüksek değer 19.10 mm ile 2 mgl^{-1} BA içeren gurupta, en düşük değer 13.44 mm olarak, kontrol gurubunda ortaya çıktmıştır. Kontrol ve 8 mgl^{-1} BA uygulamaları dışında %100 kallus oluşumu görülürken en az kallus oluşumu kontrol grubunda tespit edilmiştir. Nod sayısı bakımından değerlendirildiğinde en yüksek olan ortamın 2 mgl^{-1} BA uygulamasıyla elde edildiği görülmekte ve 10.70 değerinde bir ortalama yakalanmıştır. En düşük nod sayısının 0.5 ve 4 mgl^{-1} BA uygulamalarından 7.68 ve 7.95 oranlarıyla elde edilmiştir. Uç kararması bakımından 0.5 ve 2 mgl^{-1} BA ygulamaları en düşük değerleri vermiştir. 0.5 mgl^{-1} BA uygulamasında yapılan morfolojik gözlemlere bakılırsa sürgünler canlı ve parlak yeşil renkte, yeni sürgünler oluşurken ana sürgün kurumamış ve nod sayılarını artırırken nodlar arası mesafe oldukça kısa yoğun bir yaprak görünümüne sahip bitkicikler oluşturmuştur. 2 mgl^{-1} BA denemelerinde sürgünlerdeki proliferasyon oranı diğer ortamlara nazaran daha iyi gelişme göstermiştir. 8 mgl^{-1} BA uygulamasında sürgünlerin gelişimi yavaşlamış ve bazı sürgünlerde uç kararması bağlı sararmalar meydana gelmiştir. 4 mgl^{-1} BA uygulamasında ise sürgün uzunluğu olarak iyi sonuçlar alınmasına karşın sürgün sayısındaki oran 2 mgl^{-1} BA uygulamasının gerisinde

kalmıştır. Ölçülen parametreler göz önünde bulundurulduğunda *Klon-I* için en uygun ortamın 2 mgl^{-1} BA uygulaması olduğu tespit edilmiş ve daha sonraki proliferasyon çalışmalarında bu oran kullanılmıştır (Şekil 4.24.a., 4.24.b., 4.24.c., 4.24.d., 4.24.e., 4.24.f.).

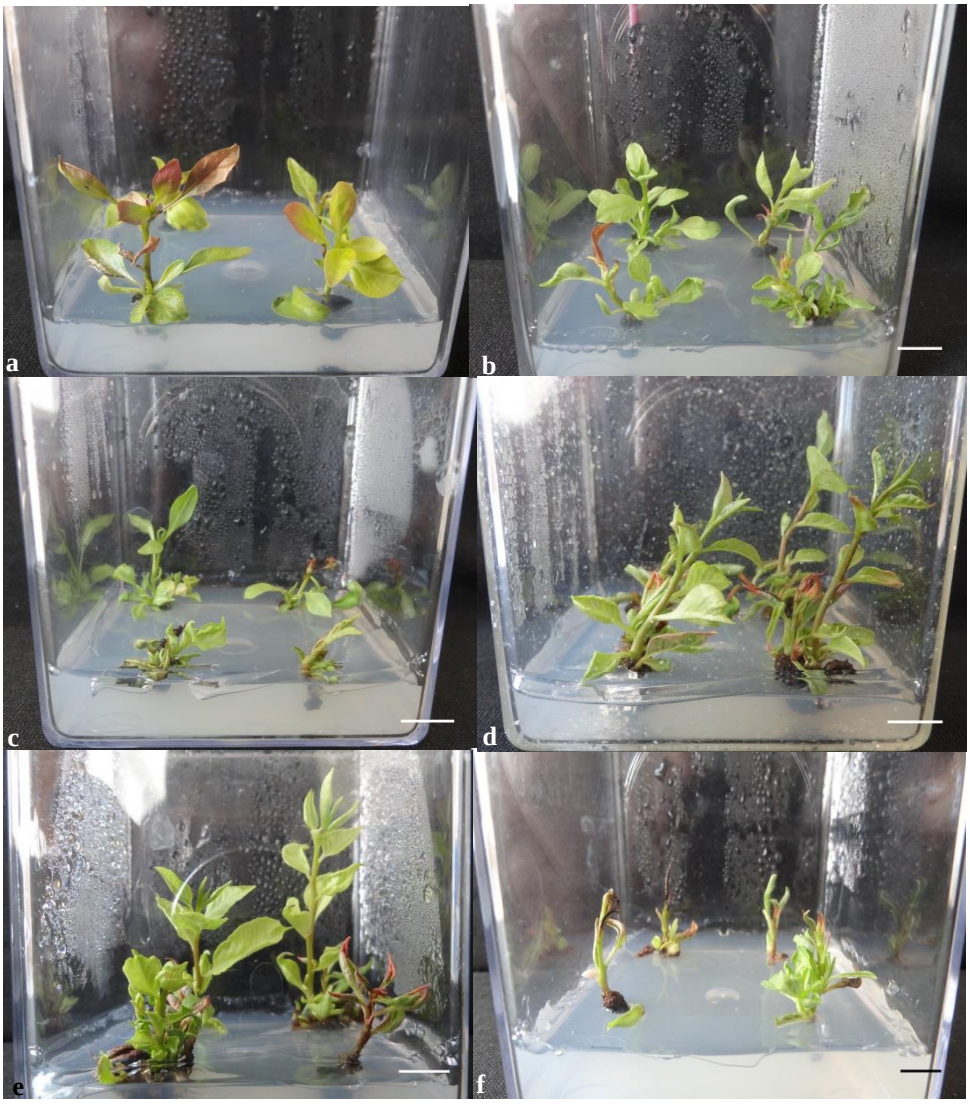
Çizelge 4.12. Sürgün proliferasyonuna farklı BA konsantrasyonlarının etkisi*

Klonlar	BA (mgl^{-1})	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)	Nod Sayısı ± SH	Uç Kararması ± SH (%)	Kallus Oluşturan Eksplant ± SH (%)
Klon-I	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 c	13.44 ± 0.65 b	9.11 ± 0.29 b	30.00 ± 0.10 a	15.00 ± 0.08 b
	0.5	2.90 ± 0.19 a	13.92 ± 0.65 b	7.68 ± 0.29 c	0.00 ± 0.00 c	100.0 ± 0.00 a
	1	2.35 ± 0.20 b	16.60 ± 1.54 ab	8.42 ± 0.27 bc	12.77 ± 0.04 bc	100.0 ± 0.00 a
	2	3.05 ± 0.21 a	19.69 ± 0.68 a	10.70 ± 0.60 a	3.28 ± 0.02 c	100.0 ± 0.00 a
	4	2.10 ± 0.16 b	16.74 ± 0.62 ab	7.95 ± 0.40 bc	7.14 ± 0.04 c	100.0 ± 0.00 a
	8	1.20 ± 0.09 c	13.95 ± 0.75 b	8.16 ± 0.46 bc	20.38 ± 0.08 ab	20.0 ± 0.08 b
s.d: 0.419 (F = 4.362)		**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-II	**Kontrol**	1.00 ± 0.00 d	19.65 ± 0.71 ab	10.80 ± 0.53 a	33.00 ± 0.07 a	65.00 ± 0.10 b
	0.5	2.95 ± 0.25 a	17.31 ± 1.00 b	8.76 ± 0.21 b	5.00 ± 0.05 b	100.0 ± 0.00 a
	1	2.05 ± 0.21 c	21.08 ± 1.56 a	7.46 ± 0.42 c	17.07 ± 0.05 bc	100.0 ± 0.00 a
	2	2.15 ± 0.08 bc	16.60 ± 1.20 b	7.44 ± 0.44 c	23.26 ± 0.06 bc	100.0 ± 0.00 a
	4	2.20 ± 0.20 bc	16.99 ± 0.99 b	8.50 ± 0.34 bc	6.82 ± 0.03 b	100.0 ± 0.00 a
	8	2.70 ± 0.30 ab	10.45 ± 0.63 c	5.51 ± 0.21 d	9.26 ± 0.03 b	100.0 ± 0.00 a
s.d: 0.023 (F = 3.491)		**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.005 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-III	**Kontrol**	1.05 ± 0.05 c	11.18 ± 0.25 b	8.76 ± 0.56 ab	0.00 ± 0.00 c	38.00 ± 0.10 c
	0.5	2.50 ± 0.26 a	17.31 ± 0.93 a	9.60 ± 0.34 a	20.00 ± 0.05 b	100.0 ± 0.00 a
	1	2.40 ± 0.28 a	13.16 ± 0.77 b	7.91 ± 0.30 b	6.25 ± 0.03 bc	100.0 ± 0.00 a
	2	1.80 ± 0.17 b	12.97 ± 0.34 b	8.88 ± 0.21 ab	8.33 ± 0.04 bc	69.44 ± 0.07 b
	4	1.95 ± 0.18 ab	11.07 ± 0.65 b	6.05 ± 0.28 c	12.82 ± 0.05 bc	76.92 ± 0.68 b
	8	1.10 ± 0.06 c	13.11 ± 0.43 b	7.81 ± 0.29 b	40.91 ± 0.10 a	27.27 ± 0.07 c
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

**Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 20*

Klon-II genotipi için yapılmış olan deney testinde; sürgün sayısı bakımından en yüksek değeri 2.95 adet ile 0.5 mgl^{-1} BA konsantrasyonundan elde edilmiştir. 0.5 mgl^{-1} BA uygulamasında esas sürgünü kurutarak yeni sürgünler oluşturmuştur. Yeni oluşan sürgünler ve nod sayılarına bakıldığında bitkiler oldukça yoğun görünümdeydiler (Şekil 4.25.). En düşük değeri ise hiçbir proliferasyon belirtisi göstermeyen kontrol grubundan alınmıştır. 21.08 mm uzunluğu ile en iyi sürgün uzaması 1 mgl^{-1} BA uygulamasında ölçülmüştür. En kısa sürgün uzunluğu ve nod sayısı 10.45 mm ile 8 mgl^{-1} BA uygulamasında elde edilmiştir. Nod sayısı bakımından en iyi ortam 10.80 ile kontrol grubu olmuştur. En az uç kararması %5.00 ile 0.5 mgl^{-1} BA deney setinden elde edilmiştir. Kallus oranlarına bakıldığında kontrol grubu dışında diğer bütün uygulamalarda %100 kallus oluşumu mevcuttur. Yapılan olan deney sonuçları

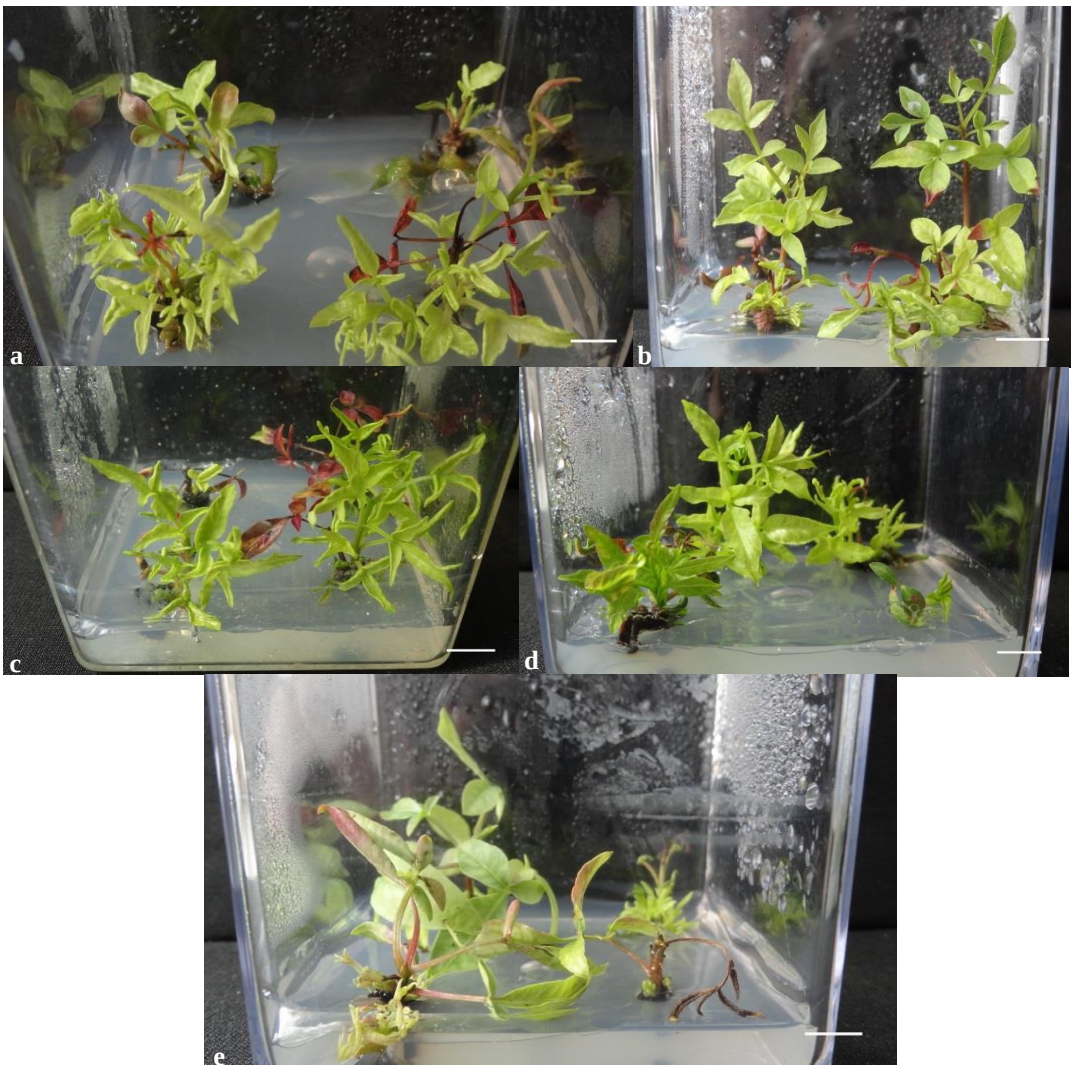
değerlendirildiğinde Klon II için en uygun proliferasyon konsantrasyonun 1 mgl^{-1} BA olduğu belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda *Klon-II* genotipi için bu konsantrasyon kullanılmıştır.



Şekil 4.24. *Klon-I* genotipinde farklı BA konsantrasyonlarının sürgün gelişimine etkileri: **a)** BBD'siz, **b)** 0.5 mgl^{-1} BA (Bar: 6 mm), **c)** 1 mgl^{-1} BA (Bar: 9 mm), **d)** 2 mgl^{-1} BA (Bar: 23 mm), **e)** 4 mgl^{-1} BA (Bar: 17 mm), **f)** 8 mgl^{-1} BA (Bar: 14 mm)

Klon-III genotipi için yapılmış olan deney testinde; sürgün sayısı bakımından en yüksek değeri 2.50 adet ile 0.5 mgl^{-1} BA konsantrasyonundan elde edilmiştir. 0.5 mgl^{-1} BA uygulamasında esas sürgünü kurutarak yeni sürgünler oluşturmuştur. Yeni oluşan sürgüler ve nod sayılarına bakıldığında bitkiler oldukça yoğun görünümdeydiler. En düşük değeri ise 1.05 değer ile kontrol grubundan alınmıştır. 17.31 mm uzunluğu ile en iyi sürgün uzaması 0.5 mgl^{-1} BA uygulamasında ölçülmüştür. En kısa sürgün uzunluğu

11.07 mm ile 4 mgl^{-1} BA uygulamasında ölçüldü. Nod sayısı bakımından en iyi ortam 9.60 ile 0.5 mgl^{-1} BA grubu olmuştur. En az uç kararması %0 ile kontrol deney setinden elde edilmiştir. Kallus oranlarına bakıldığında en az kallus oluşumu 8 mgl^{-1} BA uygulamasında elde edilmiştir. 8 mgl^{-1} BA uygulamasında bazı sürgünlerde köklenmeler gözlenmiştir. En çok kallus oluşumu 0.5 ve 1 mgl^{-1} BA uygulamalarında ölçülmüştür. *Klon-III* için en uygun BA konsantrasyonu bu deney sonucunda sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayıları bakımından en iyi değerleri verdiği için 0.5 mgl^{-1} BA ortamı olduğu ortaya konulmuştur. Bundan sonra yapılan deney setlerinde *Klon-III* için 0.5 mgl^{-1} BA kullanılmıştır.



Şekil 4.25. *Klon-II* genotipinin **s**ürgün proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi: **a)** 0.5 mgl^{-1} BA (Bar:6 mm), **b)** 1 mgl^{-1} BA (Bar: 11 mm), **c)** 2 mgl^{-1}BA (Bar: 26 mm), **d)** 4 mgl^{-1} BA (Bar: 12 mm), **e)** 8 mgl^{-1} BA (Bar: 12 mm)

4.6.8. Sürgün Proliferasyonuna BA-Oksin Kombinasyonunun Etkisi

Bir önceki çalışmada sürgün proliferasyonuna en iyi cevap veren itokinin konsantrasyonu (*Klon-I* için 2 mgl^{-1} BA ve *Klon-II* için 1 mgl^{-1} BA ve *Klon-III* için 0.5 mgl^{-1} BA) tespit edildi. Bu deneyde sitokinin konsantrasyonları kontrol gurubu ile birlikte çeşitli oksin konsantrasyonlarının ilave edilmesiyle sürgün proliferasyonu üzerine etkileri araştırıldı ve sonuçlar Çizelge 4.13., Çizelge 4.14. ve Çizelge 4.15.'de verildi.

Klon-I için en iyi BA konsantrasyonuna çeşitli miktarlarda ve türde oksin ilave edilmiş ve sürgünlerin proliferasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Klon I de bu çalışma için en fazla prolifere olan eksplant yüzdesini %95 ile kontrol grubu vermiştir. En fazla sürgün sayısı 3.05 ile yine kontrol (2 mgl^{-1} BA) uygulaması vermiştir. En düşük sürgün sayılarını veren ise 1.30 ile 2 mgl^{-1} BA + 0.5 mgl^{-1} NAA ve 2 mgl^{-1} BA + 0.2 mgl^{-1} IAA uygulamaları olmuştur. Ortalama sürgün uzunluğunda en yüksek değer 16.60 mm ile kontrol (2 mgl^{-1} BA) gurubunda, en düşük değer 9.47 mm ile 2 mgl^{-1} BA + 0.5 mgl^{-1} NAA gurubunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13.).

Çizelge 4.13. *Klon-I* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi*

Klonlar	BA/Oksin (mgl^{-1})	Prolifere Olan Eksplant ± SH (%)	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-I	**Kontrol (2 BA)**	95.00 ± 0.05 a	3.05 ± 0.21 a	16.60 ± 0.82 a
	2 BA + 0.5 IAA	55.00 ± 0.11 b	1.60 ± 0.11 b	12.85 ± 0.36 bc
	2 BA + 0.5 IBA	70.00 ± 0.10 ab	1.65 ± 0.10 b	13.39 ± 0.67 b
	2 BA + 0.5 NAA	30.00 ± 0.20 b	1.30 ± 0.10 b	9.47 ± 0.46 d
	2 BA + 0.2 IAA	25.00 ± 0.10 c	1.30 ± 0.10 b	12.34 ± 1.08 bc
	2 BA + 0.2 IBA	30.00 ± 0.09 c	1.40 ± 0.13 b	13.93 ± 0.56 bc
	2 BA + 0.2 NAA	35.00 ± 0.10 c	1.45 ± 0.13 b	11.14 ± 0.42 cd
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

*Veriler kültürün 28. gününde 20 eksplantın ortalamasıdır.

Klon-II için en iyi BA konsantrasyonuna çeşitli miktarlarda ve türde oksin ilave edilmiş ve sürgünlerin proliferasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. *Klon-II* de bu çalışma için en fazla proliferasyon %75 ile 1 mgl^{-1} BA + 0.2 mgl^{-1} IBA grubu vermiştir. En fazla ortalama sürgün sayısı 2.05 ile kontrol (1 mgl^{-1}BA) uygulaması vermiştir. En düşük sürgün sayılarını veren ise 1.35 ile 1 mgl^{-1} BA + 0.5 mgl^{-1} IAA uygulaması olmuştur. Ortalama sürgün uzunluğunda en yüksek değer 21.08 mm ile kontrol (1 mgl^{-1} BA)

gurubunda, en düşük değer 13.10 mm ile 1 mgl^{-1} BA + 0.5 mgl^{-1} IAA gurubunda ölçülmüştür (Çizelge 4.14.).

Çizelge 4.14. *Klon-II* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi

Klonlar	BA/Oksin (mgl^{-1})/	Prolifere Olan Eksplant ± SH (%)	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-II	**Kontrol (1 BA)**	65.00 ± 0.10 ab	2.05 ± 0.21 a	21.08 ± 1.6 a
	1 BA + 0.5 IAA	50.00 ± 0.11 ab	1.35 ± 0.13 b	13.10 ± 0.59 c
	1 BA + 0.5 IBA	55.00 ± 0.11 ab	1.40 ± 0.11 b	16.11 ± 0.89 bc
	1 BA + 0.5 NAA	35.00 ± 0.10 b	1.60 ± 0.13 b	15.15 ± 0.72 bc
	1 BA + 0.2 IAA	65.00 ± 0.10 ab	1.55 ± 0.15 b	15.32 ± 1.32 bc
	1 BA + 0.2 IBA	75.00 ± 0.09 a	1.50 ± 0.13 b	17.54 ± 1.61 ab
	1 BA + 0.2 NAA	63.00 ± 0.11 ab	1.78 ± 0.12 ab	16.57 ± 1.44 bc
		P = 0.21 > 0.05	**P = 0.01 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

Veriler kültürün 28. gününde 20 ekplantın ortalamasıdır.

Klon-III için en iyi BA konsantrasyonuna çeşitli miktarlarda ve türde oksin ilave edilmiş ve sürgünlerin proliferasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. *Klon-III* de bu çalışma için en fazla prolifere olan eksplant yüzdesini %100 ile 1 BA mgl^{-1} + 0.2 mgl^{-1} IAA grubu vermiştir. En fazla ortalama sürgün sayısı 2.40 ile kontrol (0.5 mgl^{-1} BA) uygulaması vermiştir. En düşük sürgün sayılarını veren ise 1.45 ile 1 mgl^{-1} BA + 0.5 mgl^{-1} IAA uygulaması olmuştur. Ortalama sürgün uzunluğunda en yüksek değer 17.82 mm ile 1 mgl^{-1} BA + 0.2 mgl^{-1} IAA gurubunda, en düşük değer 11.30 mm ile 1 BA mgl^{-1} + 0.5 mgl^{-1} IAA gurubunda ölçülmüştür (Çizelge 4.15.).

Çizelge 4.15. *Klon-III* genotipinde sürgün proliferasyonuna BA/oksin kombinasyonunun etkisi

Klonlar	BA/Oksin(mgl^{-1})	Prolifere Olan Eksplant ± SH (%)	Sürgün Sayısı ± SH	Sürgün Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-III	**Kontrol (0.5 BA)**	65.00 ± 0.10 ab	2.40 ± 0.28 a	13.16 ± 0.77 bc
	0.5 BA + 0.5 IAA	60.00 ± 0.11 b	1.45 ± 0.11 D	11.30 ± 0.28 c
	0.5 BA + 0.5 IBA	100.00 ± 0.11 a	2.00 ± 0.00 abc	14.62 ± 0.45 b
	0.5 BA + 0.5 NAA	60.00 ± 0.11 b	1.60 ± 0.13 cd	14.90 ± 0.32 bc
	0.5 BA + 0.2 IAA	100.00 ± 0.10 a	2.25 ± 0.12 ab	17.82 ± 1.24 a
	0.5 BA + 0.2 IBA	90.00 ± 0.06 a	1.80 ± 0.11 cd	13.66 ± 0.67 bc
	0.5 BA + 0.2 NAA	80.00 ± 0.09 ab	1.90 ± 0.10 bc	13.14 ± 0.65 bc
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

Veriler kültürün 28. gününde 20 eksplantın ortalamasıdır.

Özetlenecek olursa her üç klonun sürgün proliferasyon çalımalarında BA'ya ilave olarak test edilen oksinlerin kültürlerde sürgün gelişimine pozitif etki yapmadığı görülmüştür.

4.7. Sürgün Proliferasyon Çalışmalarıyla İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

İn vitro sürgün rejenerasyonu veya proliferasyonu yoluyla mikroçoğaltım işlemi 1970'lerden beri bir kısım ılıman iklim meyvelerinde ve özellikle sert kabuklu meyvelerde uygulanmaktadır. Bu yöntem başlangıçta çilek ve ahududu gibi meyvelerde ve sonraları şeftali gibi sert çekirdekli meyvelere anaç üretimi amacıyla kullanılmış ve bundan sonra yaygınlaşmaya başlamıştır (**Zimmerman ve Deberg 1991**).

Antepfıstığının çoğaltılmasında çeşitli ilerlemeler kaydedilmiştir. Aksillar sürgün oluşumu ve sürgün uzamasını; eksplant tipi, ana bitkiden eksplantın alınma pozisyonu, eksplantların toplanma zamanı, kullanılan besi ortamları, alt kültür sayıları gibi hususlar etkilemektedir.

Antepfıstığının olgun tohumlarından elde edilen aksenik sürgünlerin *in vitro* çoğaltımı çalışmaları ilk kez **Barghchi** (**1982**) tarafından gerçekleştirilmiştir. *P. vera*'nın sürgün proliferasyonu için yapılan çalışmada kullanılan sitokinin çeşitleri arasında kinetinin BA'dan daha zayıf kaldığı ve *P. vera'*nın sürgün proliferasyonu için en iyi konsantrasyonun 4 mgl^{-1} BA olduğu bildirilmiştir (**Barghchi 1982; Abousalim 1990**).

Farklı bitki türlerinde sürgün proliferasyonu için kullanılacak besi ortamı çeşidinin değiştiği görülmektedir. *İn vitro* sürgün proliferasyonunda bitki doku kültürü için en fazla kullanılan besi ortamıları; MS (**Murashige Skoog 1962**), B5 (**Gamborg ve ark. 1968**), SH (**Schenk ve Hildebrandt 1972**), QL (**Quoirin ve ark. 1977**), WPM (**Lloyd ve McCown 1980**), Rugini ve Verma (**Rugini ve Verma 1983**) ve DKW (**Driver ve Kuniyuki 1984**) sayılabilir.

Antepfıstığı anaçları için *in vitro* ortamda sürgün çoğaltımında en fazla kullanılan besi ortamı MS olmuştur. **Barghchi** (**1982**), **Martinelli** (**1988**), **Abousalim** (**1990**), **Onay** (**2000**), **Tilkat ve ark.** (**2008**), **Ayaz-Tilkat ve ark.** (**2011**) olmak üzere çok araşıtmacı *P. vera*'nın sürgün proliferasyonu için MS besi ortamını önerirken, **Alsafadi ve Elias** (**2010**), Rugini ve Verma besi ortamının MS ortamından daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca MS besi ortamı *P. khinjuk* (**Tilkat ve ark. 2005; Akdemir ve ark. 2014**), *P. atlantica* (**Safari ve ark. 2013; Akdemir ve ark. 2014**) türleri içinde en iyi ortam olduğu bildirilmiştir. **Barghchi** (**1985**), *in vitro* çimlendirilmiş

P. terebinhus tohumlarından elde ettiği sürgün uçlarının proliferasyonu için WPM besi ortamının kullanılmasıyla başarıldığını bildirmiştir. **Garcia ve ark.** (**2012**) ise *P. terebinhus* türünün *in vitro* sürgün çoğaltımı için DKW, MS ve WPM besi ortamlarını çalışılmış ve DKW'nin diğer besi ortamı çeşitleri içinde daha proliferasyon potansiyeline sahip olduğu bildirmişlerdir. *İn vitro* çimlendirilmiş sakız ağacı (*P. lentiscus*) tohumlarının sürgün uçları ile yapılan MS, DKW, QL ve WPM besi ortamı çeşitlerinin kıyaslandığı proliferasyon çalışmalarında, en iyi sonucun MS besi ortamı kullanımında başarıldığı rapor edilmiştir (**Yıldırım 2012**).

İyi bir sürgün çoğaltımında kullanılan besi ortamının önemi kadar kullanılan büyüme düzenleyicisininde payı vardır. Bu bağlamda sürgün proliferasyonu için en fazla tercih edilen bitki büyüme düzenleyicileri, benzil adenin (BA), izopentil adenin (2iP), Kinetin (K) ve Thidiazuran (TDZ)'dır (**Babaoğlu ve ark. 2002**).

Antepfıstığına anaç olabilecek *Pistacia* türlerinde *in vitro* sürgün proliferasyonu için çeşitli BBD ve bunların konsantrasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda sonuçlar değişmekle birlikte ortaya konulmuştur. **Sheibani ve Williers** (**1995**), *P. vera*, *P. terebinthus* ve *P. mutica* türleri için 5 mgl^{-1} BA kullanımının en iyi sonucu verdiğini, **Onay** (**2000**) tarafından yapılan çalışmada *P. vera* türünde 2 mgl^{-1} BA kullanımı ile sürgün proliferasyonunun başarıldığını, **AL-Safadi ve Elias** (**2010**), yaptığı çalışmada ise 0.75 mgl^{-1} NAA + 0.75 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BA kombinasyonunun en iyi sonuç verdiğini bildirirken, **Ayaz-Tilkat ve ark.** (**2011**) 1 mgl^{-1} BA + 1 mgl^{-1} GA_3 kombinasyonunu önermiştir. **Benmahioul ve ark.** (**2012**), 4 mgl^{-1} BA kullanımının en iyi sonucu verdiğini, **Safari ve ark.** (**2013**) *P. atlantica* türünde 2 mgl^{-1} BA kullanımını önerirken, **Garcia ve ark.** (**2012**) *P. trebinthus* için 1.12 mgl^{-1} + 0.1 mgl^{-1} IBA kullanımını önerirken, **Tilkat ve ark.** (**2005**) tarafından *P. khinjuk* türünde tohumdan *in vitro* çoğaltılmış sürgün uçlarının proliferayonu için 2-4 mgl^{-1} BA kullanımı durumunda mikroçoğaltım için başarılı sonuçlar elde edileceğini bildirmiştir.

Onay (**1996**), meyve veren antepfıstığı ağaçlarından apikal ve lateral tomurcuklardan elde ettiği sürgünlerin proliferasyonunda sitokininlerden BA'nın kinetin, 2iP ve Zeatin'e göre daha iyi sonuç verdiği ve BA sürgün proliferasyonunda 2-4 mgl^{-1} aralığında optimal değerde kullanılabileceğini rapor etmiştir

Barghchi (**1982**), *P. vera* ile yaptığı sürgün proliferasyon çalışmasında alt kültür ortamına 4 mgl^{-1} BA eklenmesiyle 35-40 sürgüne kadar elde ettiğini bildirmiştir. Bir diğer araştırmacı **Pontikis** (**1984**) ise BA'ın düşük konsantrasyonlarının çoğaltım oranlarını aynı zamanda dört aylıktan dört yıllığa kadar olan *P. atlantica*'da (0.7 mgl^{-1}), *P. integerrima*'da (1 mgl^{-1}) olgun *P. terebinthus*'ta ise (2.5 mgl^{-1}) olarak tespit etmiştir.

Barghchi ve Alderson (**1985**), kültür ortamına az bir miktarda (0.05 mgl^{-1} oranında) NAA ilavesinin kültüre alınan eksplantların büyümesini inhibe ettiğini rapor etmiş ve aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise NAA'in yüksek konsantrasyonlarının *P. vera* sürgünlerinde kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. 4 mgl^{-1} BA içeren kültür ortamına 0.25-4 mgl^{-1} GA_3 ya da GA_{4+7} nin eklenmesiyle sürgün proliferasyonu ve büyümenin oluşmadığı da aynı çalışmada rapor edilmiştir (**Barghchi ve Alderson 1983**).

Başka bir çalışmada **Bustamante-Garcia** (**1984**)'ya göre BA için en iyi değer *P. atlantica* için 1 mgl^{-1} dir. Aynı araştırıcılar alt kültür için optimum şartlarda sürgün üretiminin, iki haftada bir BA+GA_3+IBA ile desteklenmiş besi ortamına taze uçların nodlarıyla birlikte transfer edilmesiyle başarılabileceğini bildirmişlerdir.

Abousalim (**1990**), BA'nın en uygun konsantrasyonları alt kültür çalışmalrında sürekli kullanılması durumunda sürgünlerin bodur ve çok küçük yapraklı olacağını bildirmiştir.

Onay (**2000b**), *P. vera'nın* olgun dişi ağaçlarından elde edilen aksenik sürgünlerin proliferasyonu sonrası, alt kültürlerde, daha önceki çalışmalarında bildirdiği en uygun BA konsantrasyonu olan 2-4 mgl^{-1} değerlerinde herhangi bir farklılık olup olmadığını belirlemek için yapmış olduğu bir başka çalışmada, kullanılacak en uygun BA konsantrasyonunun 1-2 mgl^{-1} olduğunu rapor etmiştir.

Başka bir çalışmada **Parfitt ve Almehdi** (**1994**) 1-3 yaşında seralarda büyütülmüş, *P.atlantica* × *P.integerrima* hibritinden elde edilmiş sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında en iyi sonuç veren BBD'nin, **Barghchi** (**1982**), **Barghchi ve Alderson** (**1985**), **Onay** (**1996; 2000a**) ve **Abousalim** (**1990**)'ın bildirdikleri gibi BA'ın aksine 0.1 mgl^{-1} TDZ olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada kontrollü tozlaşma ile elde edilmiş melez *Pistacia* ağaçlarından alınan tohumlardan (*Klon-I, II, III*) *in vitro* kültür başlatıldıktan sonra, en iyi gelişen

tohumun mikroçoğaltılması ile aksenik apikal sürgünler kullanılarak *in vitro* koşullarda sürgün proliferasyonu için; en etkili BBD çeşidinin bütün klonlar için MS olduğu, en iyi MS kuvvetinin *Klon-I* için 2/1 MS, *Klon-II* ve *Klon-III* için ise 1/1 MS kuvveti olmuştur. En iyi sitokinin ise *Klon-I* için 2 mgl^{-1} BA, *Klon-II* için 1 mgl^{-1} BA, *Klon-III* için 0.5 mgl^{-1} BA olduğu belirlenmiştir.

Karbonhidrat kaynağı bitki besi ortamının temel taşları arasındadır. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeteri kadar karbonhidrat sentezi yapamadıkları için enerji kaynağı olarak besi ortamına eklenen çeşitli şekerleri kullanmak durumundadırlar. Besi ortamında enerji kaynağı olarak en çok tercih edilen sukroz olmakla birlikte glikoz, maltoz, fruktoz ve rafinoz kullanılmaktadır (**George 1993**).

P. vera (**Onay 2000; Benmahioul ve ark. 2012**), *P. khinjuk* (**Tilkat ve ark. 2005**), *P. terebinthus* (**Garcia ve ark. 2012**), *P. atlantica* (**Safari ve ark. 2013**) ve *P. lentiscus* (**Yıldırım 2012**) türleri ile *in vitro* yapılan sürgün proliferasyon çalışmalarda besi ortamına eklenecek şeker miktarının 30 gl^{-1} olması durumunda başarılı sonuçlar alınacağını bildirmişlerdir.

AL-Safadi ve Elias (**2010**), serada yetiştirilmiş *P. vera* fidanından alınan sürgünlerinin kullanılmasıyla başlatılan *in vitro* kültürlerde sürgün proliferasyonu için 30 gl^{-1} olmak maltoz ve sukroz karbonhidrat kaynağı olarak test etmiş ve sukrozun maltoza göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmiştir. Ayrıca besi ortamına ilave edilen aktif kömürün sürgün sayısı, sürgün uzunluğunu, kök sayısı ve kök uzunluğunda ciddi artışların olduğunu rapor etmiştir.

Daha önce rapor edilen çalışma sonuçlarına paralel sonuçlar elde ettiğimiz bu tez çalışmasında; *in vitro* sürgünlerin çoğaltılmasına şeker çeşitlerinden glikoz, fruktoz, sukroz, maltozun etkisi çalışılmış ve her üç melez klon için sukrozun diğer şeker çeşitlerine göre sürgünlerin gelişimi üzerine daha iyi bir etki oluşturmuştur (Çizelge 4.9.). Sukrozun farklı miktarlarının sürgün proliferasyonu üzerine etkilerinin denendiği deney testinde ise 3 melez klonda en iyi sonuç 30 gl^{-1} sukrozun kullanıldığı grup olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10.).

4.8. Köklendirme Çalışmaları

İn vitro çoğaltılan sürgünlerin köklendirme çalışmaları kapsamından yapılan deneyler ve bu deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

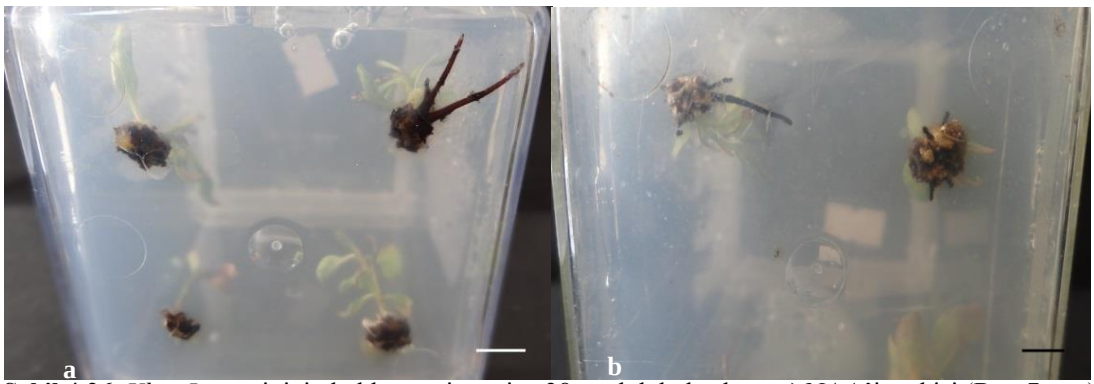
4.8.1. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

Bu deney, tohum kaynaklı sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu sonucu elde edilen 1.5-2 cm uzunluğundaki sürgünlerin köklenmesi üzerine oksin çeşitlerinin 1 mgl^{-1} (IAA, IBA, NAA, 2,4-D), konsantrasyonunda etkisini belirlemek için yapılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.16.'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. *Klon I* genotipinde köklenmeye farklı oksin tiplerinin etkisi*

Klonlar	Oksin Çeşitleri (1 mgl^{-1})	Köklenme Oranı ± SH (%)	Kök Sayısı ± SH	Kök Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-I	**IBA**	20.00 ± 0.09 a	3.00 ± 0.14 a	8.30 ± 0.59 a
	NAA	15.00 ± 0.08 ab	1.50 ± 0.08 ab	5.40 ± 0.50
	2,4 D	-**	-**	-**
	IAA	-**	-**	-**
		P = 0.04 < 0.05	**P = 0.04 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

** Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 10*
***: Köklenme olmadığı için veri kaydedilmedi.*



Şekil 4.26. *Klon-I* genotipinin köklenmesi üzerine 28 günlük kültürlere: **a)** NAA'in etkisi (Bar: 7 mm), **b)** IBA'nın etkisi (Bar: 8 mm)

Farklı oksin tiplerinin *Klon-I* genotipinde köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğuna olan etkisi istatistiki olarak önemli görülmüştür ($P < 0.05$). *Klon-II* ve *Klon-III* genotiplerinde ise her dört oksin tipinde köklenmeye rastlanmamıştır. *Klon-I* için en iyi köklenme oranına bakacak olursa en iyi sonuç 1 mgl^{-1} IBA uygulaması ile %20.00 olarak verirken bu konsantrasyondaki ortalama kök sayısı 3.00 olarak ölçüldü. Ortalama

kök uzunluğu ise en iyi IBA uygulamasında 8.30 mm olarak kaydedildi (Şekil 4.26.). Kök uzaması kültürün 7. gününde başlamıştır. Kök oluşturmayan sürgünlerde ise yoğun kallus oluşumu gözlendi. *Klon-I* için en iyi sonucu veren IBA uygulamasının diğer iki genotip içinde uygun olacağı düşünülerek farklı IBA konsantrasyonlarında kök oluşturma potansiyelleri incelenmiştir.

4.8.2. Sürgünlerin Köklenmesine IBA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu çalışma, tohumdan elde edilen sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu sonucu meydana gelen sürgünlerin köklenmesi üzerine IBA'nın, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mgl^{-1}'lik konsantrasyonlarının etkisini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Çizelge 4.17.'de elde edilen verilere uygulanan istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir.

Klon-I için köklenme yüzdesi %35 ile tek kök oluşturan konsantrasyon ile 8 mgl^{-1} IBA olmuştur. Eksplant başına düşen kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu ortalama 2.45 değeri ve 57.78 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.17. Sürgünlerin köklenmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi*

Klonlar	IBA Konsantrasyonu (mgl^{-1})	Köklenme Oranı± SH (%)	Kök Sayısı ± SH	Kök Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-I	**0.5**	-**	-**	-**
	1	-**	-**	-**
	2	-**	-**	-**
	4	-**	-**	-**
	8	35.00 ± 0.15	2.45 ± 0.18	57.78 ± 0.16
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-II	**0.5**	-**	-**	-**
	1	-**	-**	-**
	2	-**	-**	-**
	4	-**	-**	-**
	8	10.00 ± 4.10	1.10 ± 0.52	21.63 ± 0.17
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-IIII	**0.5**	-**	-**	-**
	1	-**	-**	-**
	2	-**	-**	-**
	4	15.00 ± 0.10	2.10 ± 0.11	23.78 ± 0.90
	8	40.00 ± 0.08	4.15 ± 0.10	56.08 ±0.10
		P = 0.00 < 0.05	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**

** Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 10*
*** Köklenme olmadığı için veri kaydedilmedi.*



Şekil 4.27. *Klon-III* 8 mgl^{-1} IBA konsantrasyonunda kök gelişimi (Bar: 17 mm)

Klon-II için köklenme yüzdesi %10 ile tek kök oluşturan konsantrasyon ile 8 mgl^{-1} IBA olmuştur. Eksplant başına düşen kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu ortalama 1.10 değeri ve 21.63 mm olarak ölçülmüştür.

Klon-III için köklenme yüzdesi bakımından en iyi sonucu vererek kök oluşturan IBA konsantrasyonları arasında 8 mgl^{-1} ile %40 olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen kök sayısına bakıldığında 4.15 ile 8 mgl^{-1} IBA uygulamasında ölçülmüştür. Ortalama kök uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde ise kök oluşturan IBA konsantrasyonu arasında en iyi 56.08 mm olmuştur(Şekil 4.27.). Köklenme üzerine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkilerinin araştırıldığı bu deney setinde *Klon-III* için genel bir değerlendirme yapıldığında köklenme için en uygun konsantrasyonunu 8 mgl^{-1} IBA olduğu görülmektedir. 0.5, 1ve 2 mgl^{-1} IBA ile yapılan denemelerde ise herhangi bir kök oluşumu meydana gelmemiştir.

4.8.3. Sürgünlerin Köklenmesine Sürgün Uzunluğunun Etkisi

Bu deney tohum kaynaklı sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu sonucu elde edilen sürgünlerin köklenmesi üzerine sürgün uzunluğunun etkisi 8 mgl^{-1}'lik IBA konsantrasyonunda test edilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.18.'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Sürgünlerin köklenmesine sürgün uzunluğunun etkisi*

Klonlar	Sürgün Uzunluğu (cm)	Köklenme Oranı± SH (%)	Ortalama Kök sayısı ±SH	Ortalama Kök Uzunluğu ± SH (mm)
Klon-I	**1**	10.00 ± 0.06 b	3.33 ± 0.10 a	26.86 ± 2.27 b
	2	15.00 ± 0.08 ab	5.00 ± 0.11 a	23.48 ± 1.86 b
	3	40.00 ± 0.11 a	6.50 ± 0.10 a	74.59 ± 5.18 a
	4	25.00 ± 0.09 ab	4.50 ± 0.11 a	12.86 ± 0.50 c
		P = 0.11 > 0.05	**P = 0.24 > 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-II	**1**	5.00 ± 0.05 b	0.50 ± 0.05 c	7.30 ± 0.10 c
	2	10.00 ± 0.06 b	5.60 ± 0.11 a	121.69 ± 4.77 a
	3	35.00 ± 0.10 a	3.50 ± 0.10 b	64.64 ± 0.91 b
	4	-**	-**	-**
s.d: 0.048 (F = 4.034)		**P = 0.02 > 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**	**P = 0.00 < 0.05**
Klon-III	**1**	-**	-**	-**
	2	-**	-**	-**
	3	35.00 ± 0.10	5.10 ± 0.11	101.78 ± 4.90
	4	15.00 ± 0.08	4.89 ± 0.10	76.33 ± 6.70
		P = 0.15 > 0.05	**P = 0.21 > 0.05**	**P = 0.07 < 0.05**

** Her uygulama için kullanılan sürgün sayısı: 10*
*** Köklenme olmadığı için veri kaydedilmedi.*

Klon-I için köklenme yüzdesi en yüksek (%40) olan gurubun 3 cm'lik sürgün uzunluğuna sahip eksplantlar olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu en yüksek değerleri ortalama 6.50 değeri ve 74.59 mm ile yine 3 cm'lik uygulama gurubunda tespit edilmiştir. *Klon-I* için genel bir değerlendirme yapıldığında köklenme için köklenen bitkilerin ve oluşan köklerin morfolojik olarak sağlıklı ve iyi durumda görünmeleri nedeniyle en uygun sürgün uzunluğunun 2 cm olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.28.).

Klon-II için köklenme yüzdesinde en yüksek cevabı veren sürgün uzunluğunun 3 cm'de %35 olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen kök sayısına bakıldığında 5.6 ile 2 cm ile köklenmeye bırakılan eksplantta ölçülmüştür. Ortalama kök uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde ise en uygun sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu ile 2 cm-121.69 mm olmuştur. Köklenme üzerine sürgün uzunluğunun etkisinin araştırıldığında bu deney setinde *Klon-II* için genel bir değerlendirme yapıldığında köklenme için köklenen bitkilerin ve oluşan köklerin morfolojik olarak sağlıklı ve iyi durumda görünmeleri nedeniyle en uygun eksplantın sürgün uzunluğunun 2 cm olduğu görülmektedir. 4 cm ile yapılan deney setinde ise herhangi bir köklenmeye rastlanmamıştır ve sürgünlerin kültür süresi sonunda uç kararması, yapraklarda sararmalar ve solmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.29.).



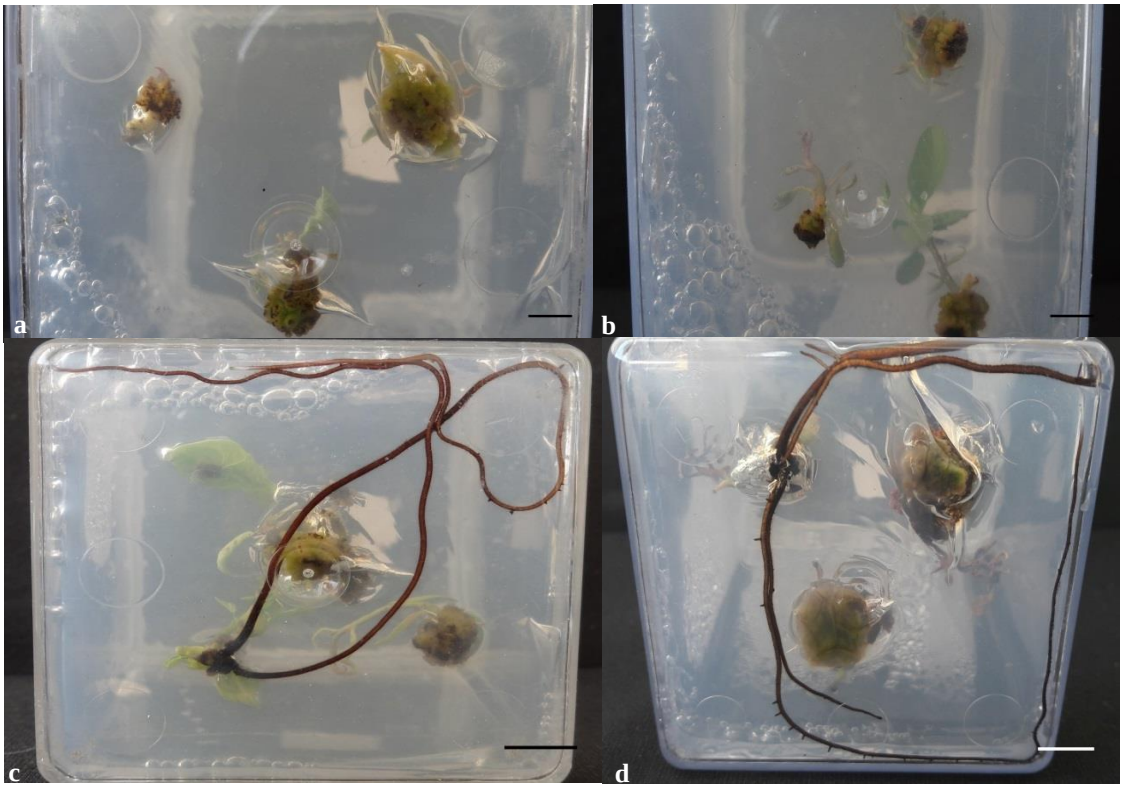
Şekil 4.28. *Klon-I* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi: **a)** 1 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi (Bar: 4.64 mm), **b)** 1 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi (Bar: 9 mm), **c)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi (Bar: 12 mm), **d)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi (Bar: 8 mm), **e)** 3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi (Bar: 8 mm), **f)** 3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi (Bar: 12 mm), **g)** 4 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi (Bar: 13 mm), **h)** 4 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenmesi (Bar: 10 mm)



Şekil 4.29. *Klon-II* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi (Bar: 16 mmm)



Şekil 4.30. a) *Klon–II* genotipinde 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının ilk dikimi (Bar: 9 mm), **b)** 2 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının köklenme durumu (Bar: 17 mm)



Şekil 4.31. *Klon-III* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi: **a)** 1 cm sürgün uzunluğundaki köklenme durumu (Bar: 6 mm), **b)** 2 cm sürgün uzunluğundaki köklenme durumu (Bar: 7 mm), **c)** 3 cm sürgün uzunluğundaki köklenme (Bar: 8 mm), **d)** 4 cm sürgün uzunluğundaki köklenme (Bar: 10 mm)

Klon-III için köklenme yüzdesinde en yüksek cevabı veren sürgün uzunluğunun 3 cm'de %35 olduğu görülmüştür. Eksplant başına düşen kök sayısına bakıldığında 5.6 ile 3 cm ile köklenmeye bırakılan eksplantta ölçülmüştür. Ortalama kök uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde ise en uygun sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu ile 3 cm - 101.78 mm olmuştur. Köklenme üzerine sürgün uzunluğunun etkisinin araştırıldığında bu deney setinde *Klon-III* için genel bir değerlendirme yapıldığında köklenme için köklenen bitkilerin ve oluşan köklerin morfolojik olarak sağlıklı ve iyi durumda görünmeleri nedeniyle en uygun eksplantın sürgün uzunluğunun 3 cm olduğu görülmektedir. 1 ve 2 cm eksplant uzunluğu ile yapılan denemelerde ise herhangi bir kök oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.31., 4.32.).



Şekil 4.32. *Klon-III* için farklı sürgün uzunluğunun köklenmeye etkisi (Bar: 17 mm)

4.9. Köklendirme Çalışmalarıyla İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Bitki doku kültürü çalışmalarının her aşamasında olduğu gibi köklendirme aşaması da büyük önem arz etmektedir. Köklenme mikroçoğaltım başarısının belirlenebilmesi için en önemli adımıdır. Bu adım sadece sürgünlerin köklenmesini içermez aynı zamanda bitkinin doğal ortamda hayatta kalabilme potansiyelinide belirler. Otsu bitkilerde adventif kök oluşumu kolayca uyarılabilir fakat odunsu bitkilerde bu uyarım daha zordur (**Bajaj 1991**). Elde edilen bitkinin arazi şartlarına aktarımı ve sağlıklı bir şekilde yaşayabilmesi için sağlıklı köklenmenin ve köklenme oranın yüksek olması gerekmektedir. *İn vitro* bitki doku kültüründe yarı katı besi ortamlarında mikroçoğaltılmış fıstıkların köklenmeye verdikleri cevaplar farklı olmuştur (**Tilkat ve ark. 2008; Benmahioul 2009; Tilkat ve Onay 2009; Akdemir ve ark. 2014**).

Doku kültürü çalışmalarında kök oluşumu için oksinler kullanılmaktadır. Köklendirici madde olarak kullanılan oksinler olarak; IAA, NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve picloram sayılabilmektedir (**Babaoğlu ve ark. 2002**). *İn vitro* çoğaltılmış bitkilerin köklenmesine; kültürü başlatılan bitkinin başlangıç eksplantın tipi (tohum, apikal meristem, nodal tomurcuk vs.), kullanılan oksin çeşidi ve konsantrasyonu, sürgün uzunluğu, karanlık uygulamaları, kullanılan şeker çeşidi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Çalışmamızda kullanılan materyalimiz kontrollü tozlaşma ile elde edilen melez tohumlar olmuştur. Melez bitkilerle çalışmanın zorlu yanlarından biri köklenmenin istenilen düzeyde gerçekleştirilmemesidir. Fakat denediğimiz parametler ile melez klonal hatların köklenmesinin beklenilen oranın üzerinde olduğu görülmüştür.

İn vitro köklenme için, yarı katı besi ortamında çoğaltımış antepfıstıklarının köklenmeye verdikleri cevaplar farklı olmuştur (**Tilkat ve ark. 2008; Benmahioul 2009; Tilkat ve Onay 2009**). **Akdemir ve ark.** (**2014**) daha düşük bir köklenme başarısı elde etmişlerdir. *İn vitro* kültürde çoğaltılmış mikrosürgünler 2 mgl^{-1}IBA içeren biyoreaktör sisteminde (RITA) ortalama 3.72 kök oluşumu ile %27.5 kökleme elde etmişlerdir. Bununla birlikte daha düşük ya da daha yüksek konsantrasyonlarda %20 (1 mgl^{-1} IBA) ve %27.5 (4 mgl^{-1} IBA) köklenme yüzdesi elde etmişlerdir.

Barghchi ve Alderson (**1983**), antepfıstığında *in vitro* köklendirme için en uygun oksin çeşitinin IBA olduğunu rapor etmişlerdir.

Bustamante-Garcia (**1984**), eksplantların köklenmesini sıvı ya da katı NAA ve IBA kullanılarak artırıldığını kaydetmişlerdir.

Pontikis (**1984**), eksplantların olgun *P. terenbinthus* olgun ağaçlarından alınan eksplantlarda köklenmenin %60 olduğunu ve köklenmeye alınacak sürgün uçlarının 10 sn 100 mgl^{-1} IBA'ya daldırıldığında köklenmenin %50 olduğunu bildirmiştir.

Barghchi ve Alderson (**1985**), yaptıkları çalışmada iki yaşındaki *P. vera*'dan aldıkları eksplantlardan sürgünlerin köklendirilmesinde üzerine denedikleri IBA'nın 2.5, 3.0 ya da 3.5 mgl^{-1} oranlarında kullanılmasında bu oranların köklenme üzerine önemli bir farklılık olmadığını ve denenen bu ortamlarda köklenmenin yaklaşık olarak %80 olduğunu bildirmişlerdir.

Martinelli (**1988**), tarafından yapılmış olan çalışmada 4 dört yaşındaki *P. vera* ağacından alınan eksplantların ön işlem olmadan köklenme oranının %30 – 40 olduğunu fakat ön işlem olarak 10 sn IBA çözeltisine daldırılğında köklenme oranın %50 olduğunu bildirmiştir.

Abousalim (**1990**), tarafından antepfıstığının optimum köklenmesi üzerine köklenme öncesi köklenme için kullanılan IBA konsantrasyonlarının yaklaşık 1 mgl^{-1} ve 2 mgl^{-1} oranlarında alt kültüre alınmış eksplantlarda daha iyi sonuç verdiğini rapor etmişlerdir.

En yüksek köklenme **Parfitt ve Almehdi** (**1994**) tarafından *P. vera* 'Kerman' çeşidinde genç materyaller (fideler) kullanıldığında %88 olarak rapor edilmiştir.

Parfitt ve Almehdi (**1994**), P. vera ile yaptıkları köklenme çalışmalarında 2.5 mgl^{-1} IBA kullanımında %88 köklenme elde edildiği rapor edilmiştir.

Dolcet-Sanjuan ve Claveria (**1995**), *P. vera* Mateur ile MS besi ortamında oksin konsantrasyonlarının değerlendirildiği çalışmada bir hafta sonra beyaz kallus oluşumunu gözlemlemişlerdir. Daha önceden rapor edilenlerin aksine (**Barghchi ve Alderson 1989; Martinelli 1988; Mederos ve Carreño 1991; Parfitt ve Almehdi 1994**), IBA'nın kök oluşumu uyarımında en iyi oksin olmadığını, NAA'in IBA ve IAA'ya göre kök uyarımında daha fazla etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Onay (**2000**), *P. vera* L.'nin olgun ağaçlarından alınan nodal segmentlerden başlatılmış *in vitro* kültürden elde edilen mikrosürgünlerin köklenmesi 4.9, 9.8 ve 19.6

μM IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında bütün ortamlar için %80 köklenme başarısı elde edilmiştir.

Tilkat ve ark. (**2005**), *in vitro* çimlenmiş tohumlardan başlatılan *P. khinjuk* Stocks sürgünleri için, en etkili köklenme ortamı olarak 0.5 mgl^{-1} IBA ile desteklenmiş MS besi olduğu rapor edilmiştir. Maksimum kök uzunluğunu 0.5 mgl^{-1} IBA ile destekli MS besi ortamından 2.98 ± 0.37 olarak bildirilmiştir.

Tilkat ve ark. (**2008**), erkek antepfıstıklarının hızlı bir şekilde proliferasyonu ve köklenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, her birinden 2 mgl^{-1} olmak üzere IBA, NAA ve IAA ile IBA'nın farklı konsantrasyonlarınının (0.5, 1, 2, 4, ve 8 mgl^{-1}) etkisini ve ayrıca eksplant boyunun (1, 2, 3 ve 4 cm) köklenmeye etkisi değerlendirilmiştir. Kök oluşumuna en etkili oksinin IBA olduğu, en yüksek köklenme oranını (%78) veren mikrosürgün uzunluğunun ise 4 cm olduğu 4 haftalık kültür sonucunda kaydedilmiştir.

Tilkat ve ark. (2009), 25 yaşındaki *P.vera* L. "Atlı" olgun ağaçlarından alınan apikal sürgünlerden alınarak başlatılan *in vitro* kültürlerde sürgünlerin köklenmesi üzerine yaptıkları çalışmada iki veya üç yaprak içeren 3 cm'den büyük mikrosürgünler 30 g L^{-1} sukroz, 5.5 g L^{-1} agar ve 9.84 μM IBA içeren tam karı MS besi ortamında köklenmeye alındılar. Köklenme çalışmaları şu şekilde devam etti. Köklenmeden önce yıkama: mikrosürgünlerin bazal uçları keskin ve steril bir bisturi yardımıyla kesildi ve 100 rpm'de 1 – 2 saat çalkalanarak durulandı. Daha sonra yıkanmamış bir kontrol grubu ile birlikte köklenme ortamına alındılar. Köklenmeden önce yıkama ve daldırma: tek bir sürgün ucundan klonlanmış mikrosürgünler steril su içeren bir Erlenmayer içinde sallayarak yıkandılar. Daha sonra kesim uçları 1, 5 ve 10 d %70'lik etil alkol ie hazırlanmış (4.92, 24.6, 49.2 μM ve bir kontrol grubu ile) IBA solüsyonuna daldırılmıştır. Daha sonra sürgünler köklenme ortamına alınmıştır. Yapılan kapsamlı köklenem çalışmaları sonucunda en yüksek köklenme oranının %92 ile 4 cm uzunluğunda sürügünlerin iki defa yıkanarak kullanılması ile yaklaşık 14 günde elde edildiği rapor edilmiştir.

Benmahioul (**2009**), antepfıstğının köklenmesi üzerine 0.25 mgl^{-1} BSAA (3-Benzo(b)selenyl Acetic Acid): %10, 0.5 mgl^{-1} BSAA %20 ve 1 BSAA mgl^{-1} : % 6.7 BSAA kullanımın çok iyi sonuçlar vermediğini bildirmişlerdir.

Delijam ve ark. (**2016**), *P. vera*'nın mikroçoğalrımı üzerine yaptıkları kapsamlı çalışmada oksinlern köklenmeye olan etkisi de araştırılmıştır. Çeşitli oksinler içeren GNH (Garoosi, Nezami ve Haddad) besi ortamında en iyi gelişen sürgün uçları (1 – 2 cm uzunluğunda) aktarılmış. Sürgünler oksin içeren GNH besi ortamında bir hafta sonra kallus oluşumu gözlendiktan sonra sürgünleri oksin içermeyen taze GNH besi ortamına aktarmıştır. İki hafta sonra kök uzamasının başladığı görülmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki bir haftalık ilk bekleme döneminde NAA'in IBA'dan daha fazla kök oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir. Yaptıkları ikinci bir köklenme deneyinde 2 mgl^{-1} NAA içeren GNH besi ortamına farklı Ca ve Fe kaynaklarının köklenemeye olan etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki Ca ve Fe kullanımının; köklenme yüzdesini, kök oluşturan ortalama sürgün sayısını, kök uzunluğunu içeren köklenme paremetrelerini önemli derecede etkilediğini bildirmişlerdir. Ca glukonat kullanımında köklenme yüzdesinin yaklaşık %50 olduğu, Fe kaynağı kullanımında ise yaklaşık %72 köklenme yüzdesi elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Marin ve ark. (**2016**), antepfıstığının köklenmesi üzerine paclobutrazolun uygun etkisini göstermek için yaptıkları çalışmada bu inhibitörün GA sentezini iyileştirdiği ve köklenmede %83.3'e ulaşıldığı bildirildi.

Son yıllarda mikroçoğaltılmış sürgünlerin köklenmesi üzerine büyük ilerlemeler sağlandı. Aslında dış ortamdaki köklenme için; sürgünlerin bazal uçları dikimden önce ticari köklenme tozlarına (%2 IBA) batırılır. Mikrosürgünler turba : perlit : vermikülit (80 : 15 : 5) karışımı içeren kaplara yerleştirildi bu kaplar kapalı plastik tepsilere alınıp daha sonra yüksek nispi nem koşulları altında muhafaza edildi. Bu yöntem ile köklenme yüzdesi bakımından en iyi sonuç %82 olarak, mikrobitki başına düşen kök sayısı da 3 – 4 kök arasında değiştiği rapor edildi (**Benmahioul 2017**).

Benmahioul (**2017**), *in vitro* çoğaltılmış antepfıstığı sürgünlerinin köklenmesi üzerine çalışmalarını iki basamakta yürütmüştür. Köklenme için seçilen sürgünler farklı oksinlerin 0.5 – 2.5 mgl^{-1} arasında (IBA ve NAA) tek olarak ya da kombinasyonlarını içeren konsantrasyonlarda yarı katı MS besi ortamında kültüre almıştır. Kültürün birinci haftasının sonunda sürgünler, kök uzaması için aynı besi ortamının hormon içermeyenine aktarılmışlardır. En iyi sonucu 1 mgl^{-1} NAA : %35, 1 mgl^{-1} IBA/ANA (1/1) %24 köklenme ve 2.5 mgl^{-1} IBA : %23.3 köklenme elde etmiştir.

Yaptığımız köklenme çalışmalarında, köklenecek sürgünün ve köklenme ortamında kullanılan oksinin türü ve konsantrasyonu üzerinde duruldu. Çalışma sonuçlarına göre ise; oksin çeşidi ve konsantrasyonundan ziyade sürgün uzunluğunun köklenmeye çok fazla etki ettiğini ve köklenme oranı bakımından değerlendirildiğinde her üç genotip için 3 cm uzunluğundaki sürgünlerin en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

4.10. Aklimatizasyon

İn vitro klonal çoğaltım ile elde edilen *Pistacia* genotiplerine ait sürgünlerin sonuçları Çizelge 4.18.'de verilmiş olan köklenmiş bitkilerin aklimatizasyonu çalışmaları kapsamında yapılan deneyler ve bu deneylerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir. Bitkilerin *in vivo* ortama alışmalarını sağlayacak olan aklimatizasyon çalışmaları, farklı seviyelerde steril edilen/edilmeyen torf materyalinin etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Aklimatizasyon çalışmaları kapsamında bitki toprağa aktarılmadan önce 16/8 saat fotoperiyod uygulanan, ışık yoğunluğunun 30 µmol m^{-2} s^{-1} olan büyüme odasında yapılmıştır. Köklenme ortamından çıkarılan köklü bitkiler beher içerisinde akan musluk suyu altında 1 saat boyunca yıkandıktan sonra, ticari olarak satılan torfun bitkilerin aklimatizasyonu üzerine olan etkisi araştırıldı. Yapılan deney kapsamında köklenmiş bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması için tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve sterilize edilmemiş olarak 3 farklı formda torf kullanılmıştır. Üç haftalık ilk adaptasyon süresi sonunda yaşayan bitkilerin yüzdeleri kaydedilmiştir. Her işlem grubu için 10 adet bitki kullanıldı. Dikimi yapılan saksıların üzeri 100 ml'lik beherler ile kapatıldı ve 16/8 fotoperiyotlu ve ışık yoğunluğu 30 µ mol m^{-2} s^{-1} olan bir büyüme odasına bırakıldı.

Çizelge 4.19. Köklenmiş bitkilerin aklimatizasyonu üzerine farklı düzeylerde sterilze edilen torfun etkisi*

Klonlar	Torf Tipi	Yaşayan Rejenerant* (%)
	Tam sterill	90
Klon-I	Yarı steril	60
	Steril edilmemiş	40
s.d: 0.089 (F = 3.003)		**P = 0.06 > 0.05**
	Tam steril	80
Klon-II	Yarı steril	50
	Steril edilmemiş	22
s.d: 0.094 (F = 3.645)		**P = 0.04 < 0.05**
	Tam steril	70
Klon-III	Yarı steril	40
	Steril edilmemiş	20
s.d: 0.092 (F = 2.803)		**P = 0.07 > 0.05**

** Her uygulama için kullanılan bitki sayısı: 10*

Köklenmiş bitkilerin aklimatizasyonu üzerine yapılan farklı düzeylerde steril edilen torfun etkileri değerlendirildiğinde *Klon-I* için yaşayan bitki yüzdesinin %90 oranla tam steril torfun en iyi sonuç verdiğini görmekteyiz. Yaşama yüzdesinin en düşük olduğu işlemin ise steril edilmemiş torf (%40) kullanımında görülmüştür. *Klon-II* ve *Klon-III* içinde yine aynı şekilde %80 ve %70 yaşama yüzdesi ile en iyi işlemin tam steril edilmiş torf kullanımında elde edilirken, en düşük yaşama oranının %22 ve %20 yüzdelerle steril edilmemiş torf uygulamasında elde edilmiştir (Şekil 4.33., 4.34.a., 4.34.b., 4.35.a., 4.35.b., 4.35.c., ve 4.36.).



Şekil 4.33. *Klon-I* bitkisinin aklimatizasyon sonrası 42. gün (Bar: 44 mm)



Şekil 4.34. *Klon-I* bitkisinin aklimatizasyon sonrası 42. gün (**a)** Bar: 43 mm**, b)** Bar: 54 mm)



Şekil 4.35. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *Klon-II* bitkileri (**a)** Bar: 20 mm, **b)** Bar: 11 mm, **c)** Bar: 25 mm)



Şekil 4.36. Saksıya aktarıldıktan 3 hafta sonraki *Klon-III* bitkileri (**a)** Bar: 16 mm, **b)** Bar: 15 mm)

4.11. Aklimatizasyon ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Mikroçoğaltım çok sayıda bitki türünün hızlı bir şekilde çoğaltılabilmesine olanak sağlar. Fakat bu yaygın kullanım dış ortama aktarılma sırasında bitkilerin büyük bir yüzdesinde meydana gelen zarar ya da kayıptan dolayı sınırlı kalmaktadır (**Pospíšilová ve ark. 1999**). *İn vitro* kültür süresince bitkiler nispeten hava geçirmez kültür kaplarında (nemin çok yüksek olduğu ve geleneksek kültür ortamlarından ışık şiddetinin daha düşük olduğu) çok özel koşullar altında büyürler. *İn vitro* ortamda çoğaltılan ve köklendirilen bitkicikler dış ortama aktarıldıktan sonra, bu genç bitkicikler çevre koşullarının ani değişimlerinden kolayca etkilenebilirler. Bu yüzden bu etkilenmeleri azaltmak ve düzeltmek için aklimatizasyon periyoduna ihtiyaç duyulur.

Barghchi ve Alderson (**1985**), yapmış olduğu adaptasyon çalışmasında *in vitro* ortamda köklendirilen bitkiciklerin toprak-turba materyalinden oluşan karışıma aktarıldığında %70-80 başarıyla yaşayabildiğini ve bitkinin aklimatizasyonu için bir tane kökün olmasının yeterli olduğunu bildirilmişlerdir.

Abousalim (**1990**), ise *P. vera* fidelerinden alınan sürgünlerin *in vitro* olarak köklendirilmesinin ardından %81.8 oranında aklimatizasyonun başarısı elde etmiştir.

Dolcet-Sanjuan ve Claveria (**1995**), *P. vera* ile yaptıkları çalışmada toprağa transfer edilen 240 bitkicikten sadece %10'nun hayatta kaldığını rapor etmişlerdir.

Onay (**1996**), *P. vera* fidelerinden alınan sürgünlerin *in vitro* olarak köklendirdikten sonra aklimatizasyonun %80 oranında başarıyla gerçekleştiğini fakat 1 yıl sonra yaşayan bitki oranının %50'den az olarak gerçekleştiğini bilfirmiştir. Yine aynı araştırıcı *in vitro* koşullarda mikroaşılı 3 haftalık fidelerin tam steril torf ve daha sonra torf : kum : toprak karışımı ile %100 oranında doğal şartlara alıştırıldığını kaydetmiştir (**Onay 2003**).

Tilkat ve ark. (**2005**), *P. vera*'nın anaçlarından biri olan *P. khinjuk* Stocks'un *in vitro* klonal çoğaltılması sonrası gerçekleştirdikleri aklimatizasyon çalışmalarında köklendirdikleri sürgünlerin tam steril torf içerisinde 1-2 hafta kademeli olarak nemlilik oranını azaltarak ve ikinci yada üçüncü haftanın sonunda steril olmayan 1:1:1 torf : kum : toprak karışımına aktardıklarında %100 başarı elde etmişlerdir.

Tilkat ve ark. (**2008**), *in vitro* köklenmiş antepfıstığı bitkiciklerini 1:1:1 oranda hazırlanmış toprak, kum ve torf ile hazırlanmış polietilen saksılara aktarılmış ve serada yapılan aklimatizasyon işlemleri ardından %90 hayatta kalma elde etmişlerdir.

Tilkat ve ark. (**2009**), 25 yaşındaki olgun antepfıstıkları ile yaptıkları çalışmada büyüme odasında %85.2 gibi yüksek bir aklimatizasyon başarısı elde etmişlerdir. Benzer şekilde steril torf karışımı içeren saksılarda sera koşullarına aktarımdan iki hafta sonra canlı kalan bitki oranını %85.4 gibi yüksek bir yüzde ile başarmışlardır.

Benmahioul ve ark. (**2012**), uygun bir biçimde sera koşullarında dış ortama aktarılan antepfıstıklarının yaklaşık %80'i aklimatize olduğu bildirilmiştir.

Yıldırım (**2012**), *P. lentiscus* türünde yaptığı çalışmada *in vitro* köklendirilen sürgünlerden elde edilen bitkicikler dezenfekte edilmiş torfta %83 oranında, dezenfekte edilmemiş torfta ise %46 oranında aklimatizasyon başarılmıştır.

Delijam ve ark. (**2016**), *P. vera*, cv. Ghazvini ile yaptıkları GNH besi ortamındaki kapsamlı mikroçoğaltım protoklolerinden sonra 10 x 9 cm boyutlarında plastik saksılarda steril edilmiş 3 turba yosunu : 1 torf kullanılarak hazırlanmış karışımda bitkileri 24° C'de 16 saat fotoperiyot (100 µ mol. $m^{-2}.s^{-1}$) uygulanan büyüme odasında 3 hafta beklettikten sonra 16 x 15 cm büyüklüğünde 1 turba yosunu : 3 perlit oranında hazırlanmış karışım bulunan daha büyük saksılara aktarmış ve sera koşullarına alınmıştır. Sonuç olarak bitkilerin yaklaşık %70'i hayatta kalmayı başardığı rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında üç haftalık bir aklimatizasyon süreci sonunda yaşayan klonların en yüksek hayatta kalma oranları steril edilmiş torf kullanımında *Klon-I* %90, *Klon-II* %80 ve *Klon-III* %70 olarak vermiştir. **Tilkat ve ark.** (**2008**) elde ettiği yüksek aklimatizasyon başarısıyla paralel sonuçlar elde edilmiştir.

4.12. Somaklonal Varyasyonların Değerlendirilmesi

4.12.1. CTAP Genomik DNA İzolasyonu

6 farklı *Pistacia* melezlerine ait klonların yaprak örneklerinden gDNA'ların izolasyonu **Lodhi ve ark. (1994)** CTAB yöntemi ile gerçekleştirilerek 260nm ve 280nm dalga boylarında ölçümleri nanodrop ile yapıldı. Her melez grubuna ait farklı altkültürleme periyotlarına ait klonlarının gDNA konsantrasyonları Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

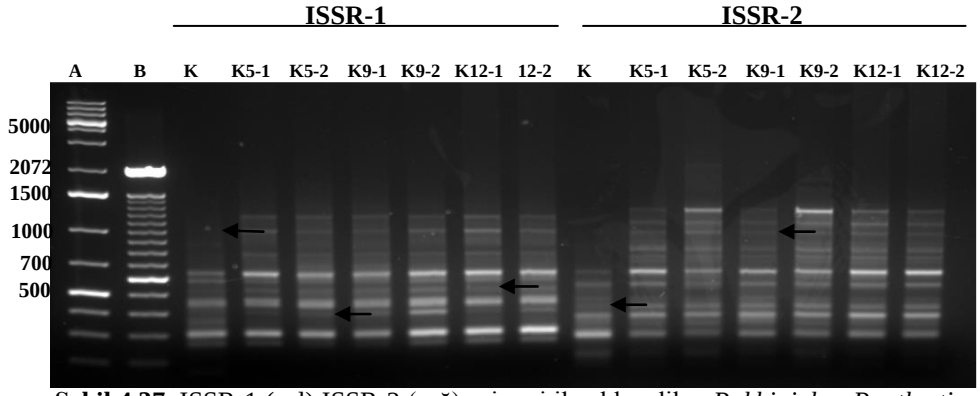
Çizelge 4.20. 6 farklı *Pistacia* melezlerinin klonlarına ait gDNA konsantrasyonu ve saflıkları

Bitki	Ay	A_{260} (ug/µL)	A_{260}/A_{280}
P. vera* × *P. atlantica	**Kontrol**	176.8	1.88
	K5-1	202.1	1.87
	K5-2	197.5	1.86
	K9-1	222.8	1.78
	K9-2	178.0	1.88
	K12-1	204.3	1.88
	K12-2	190.5	1.87
P. vera* × *P. vera	**Kontrol**	128.5	1.87
	K5-1	137.1	1.89
	K5-2	117.0	1.88
	K9-1	11.0	1.89
	K9-2	87.5	1.79
	K12-1	110.1	1.87
	K12-2	186.8	1.83
P. vera* × *P. terebinthus	**Kontrol**	296.1	1.86
	K5-1	119.8	1.90
	K5-2	156.1	1.86
	K9-1	230.4	1.85
	K9-2	133.3	1.90
	K12-1	173.1	1.91
	K12-2	206.1	1.89
P. khinjuk* × *P. atlantica	**Kontrol**	240.7	1.85
	K5-1	162.9	1.88
	K5-2	154.1	1.91
	K9-1	150.7	1.90
	K9-2	217.3	1.87
	K12-1	583.2	1.85
	K12-2	464.6	1.86
P. khinjuk* × *P. terebinthus	**Kontrol**	192.3	1.91
	K5-1	166.9	1.88
	K5-2	162.8	1.85
	K9-1	177.8	1.89
	K9-2	134.4	1.80
	K12-1	305.2	1.84
	K12-2	463.4	1.84
P. khinjuk* × *P. khinjuk	**Kontrol**	112.7	1.89
	K5-1	94.6	1.83
	K5-2	132.3	1.83
	K9-1	244.7	1.87
	K9-2	134.6	1.86
	K12-1	150.8	1.87
	K12-2	239.4	1.88

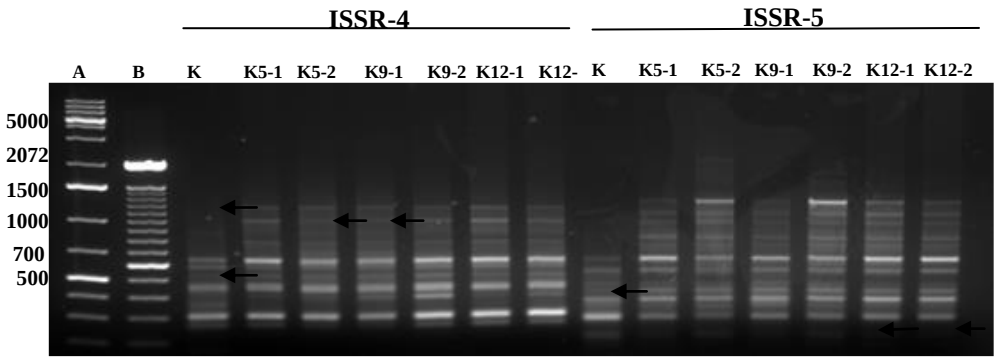
4.12.2. Somaklonal Varyasyonların ISSR ve IRAP Analizleri ile Belirlenmesi

4.12.2.1. *P. khinjuk* × *P. atlantica* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

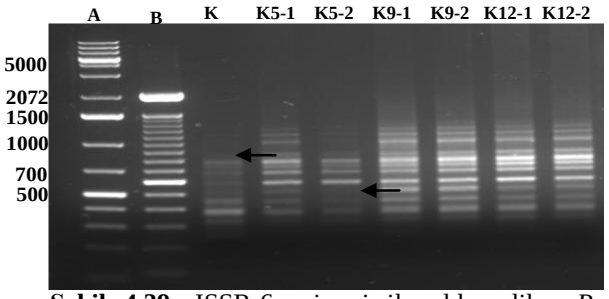
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* genotipi için gerçekleştirilen ISSR-IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla Şekil 4.37., 4.38., 4.39., 4.40., 4.41., 4.42. ve 4.43.'de görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR–PCR ve IRAP–PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



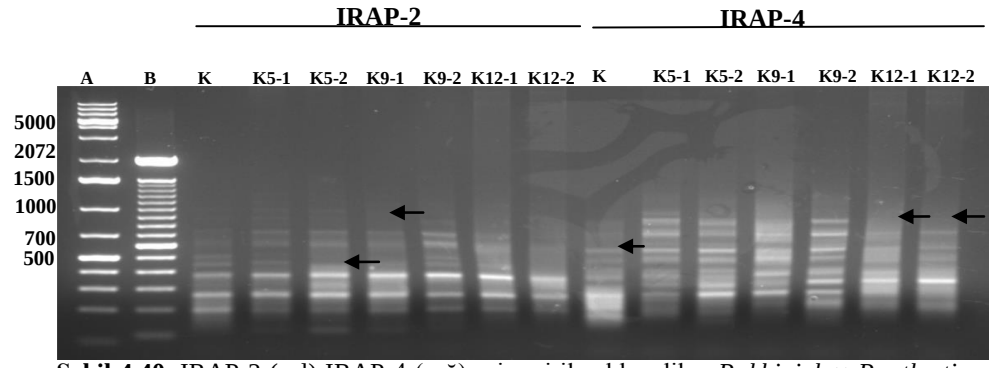
Şekil 4.37. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K:** kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1:** 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



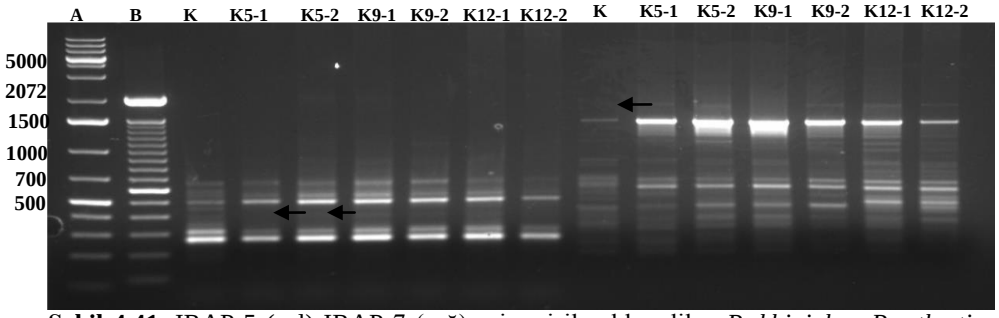
Şekil 4.38. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



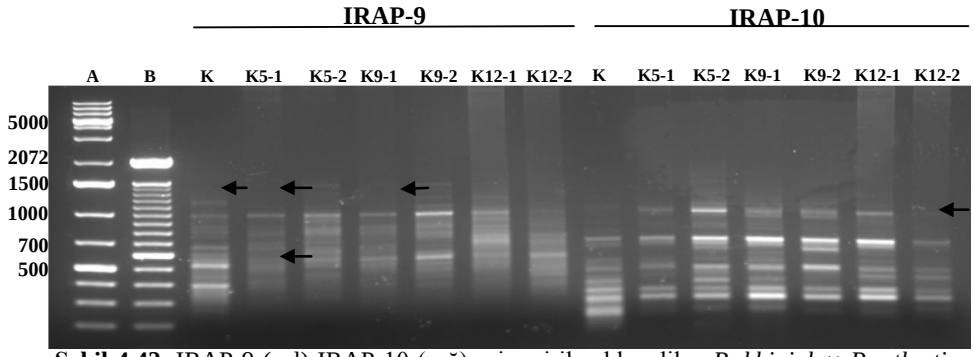
Şekil 4.39. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



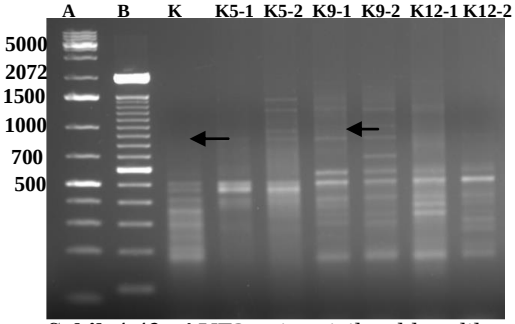
Şekil 4.40. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.41. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.42. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1:** 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2:** 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.43. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2:** 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

P. khinjuk × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri Çizelge 4.20.'de gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 75 bç'den 2.7 kb büyüklüğüne kadar toplam 157 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 7-17 arasında olmak üzere toplam 66 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 40'ı (%60.6) polimorfik olarak belirlenmiştir. IRAP primerleri için 10-17 olmak üzere toplam 91 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 65'i (%71.42) polimorfik olarak belirlenmiştir. En çok polimorfizm

oranı IRAP-9 ve AYF2 primerleri ile %92.30 ve %88.23 amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm ISSR6 primeri ile %50.0 elde edildi. PIC değerleri karşılaştırıldığında ise ISSR primerleri için en yüksek PIC değeri 0.3 ile ISSR-5 primeri oldu. En düşük PIC değerini 0.17 ile ISSR-4 primerinden elde edildi. ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.214 olarak hesaplandı. IRAP primerleri için PIC değerleri karşılaştırıldığında en yüksek PIC değeri 0.35 ile IRAP-9 primeri olurken, en düşük PIC değerini 0.17 ile IRAP-5 primeri verdi. IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.247 olarak hesaplandı (Çizelge 4.21.).

Çizelge 4.21. *P.khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	180-1200	14	8	57.14	0.19
ISSR-2	180-1750	17	10	58.82	0.17
ISSR-4	180-2070	14	9	64.28	0.23
ISSR-5	270-1000	7	6	85.51	0.3
ISSR-6	250-1350	14	7	50.0	0.18
Toplam		**66**	**40**		
Ortalama				**63.15**	**0.160**
IRAP-2	120-1000	13	8	61.53	0.22
IRAP-4	75-1000	11	7	63.63	0.2
IRAP-5	200-700	10	7	70.0	0.17
IRAP-7	200-2050	14	8	57.14	0.23
IRAP-9	280-1500	13	12	92.30	0.35
IRAP-10	75-1000	13	8	61.53	0.23
AYF2	180-2700	17	15	88.23	0.33
Toplam		**91**	**65**		
Ortalama				**70.62**	**0.247**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

Çizelge 4.22. *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	ISSR-2	ISSR-4	ISSR-5	ISSR-6	Ortalama
nP*	8	10	9	6	7	8.
nM**	6	7	5	1	7	5.2
nL***	14	17	14	7	14	13.2
pP****	0.57	0.59	0.64	0.86	0.50	0.632

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus

: Toplam lokus, *: Polimorfik lokus oranı

5 farklı ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.22.) değerlendirildiğinde, *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonunda ISSR-2 ve ISSR-4 primerleri ile 10 ve 9 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise ISSR-5 primeri ile 6 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 8'dir. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 7 bant ile ISSR-2 ve ISSR-6 primerleri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-5 ile 1 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 5.2 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.86 ile ISSR-5 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.50 ile ISSR-6 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.632 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.23. *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	**IRAP-4**	**IRAP-5**	**IRAP-7**	**IRAP-9**	**IRAP-10**	**AYF2**	**Ortalama**
nP*	8	7	7	8	12	8	15	9.286
nM**	5	4	3	6	1	5	2	3.714
nL***	13	11	10	14	13	13	17	13
pP****	0.62	0.64	0.7	0.57	0.92	0.62	0.88	0.7071

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.23.) değerlendirildiğinde *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonunda IRAP-9 ve AYF2 primeri ile 12 ve 15 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise IRAP-4 ve IRAP-5 primeri ile 7 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 9.286'dır. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 6 bant ile IRAP-7 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-9 ile 1 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 3.714 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.92 ile IRAP-9 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.57 ile IRAP-7 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.7071 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.24. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	K5-1	K5-2	K9-1	K9-2	K12-1	K12-2
Kontrol	1						
K5-1	0.53	1					
K5-2	0.49	0.75	1				
K9-1	0.52	0.87	0.78	1			
K9-2	0.52	0.87	0.73	0.90	1		
K12-1	0.51	0.85	0.74	0.86	0.95	1	
K12-2	0.51	0.86	0.72	0.84	0.90	0.95	1

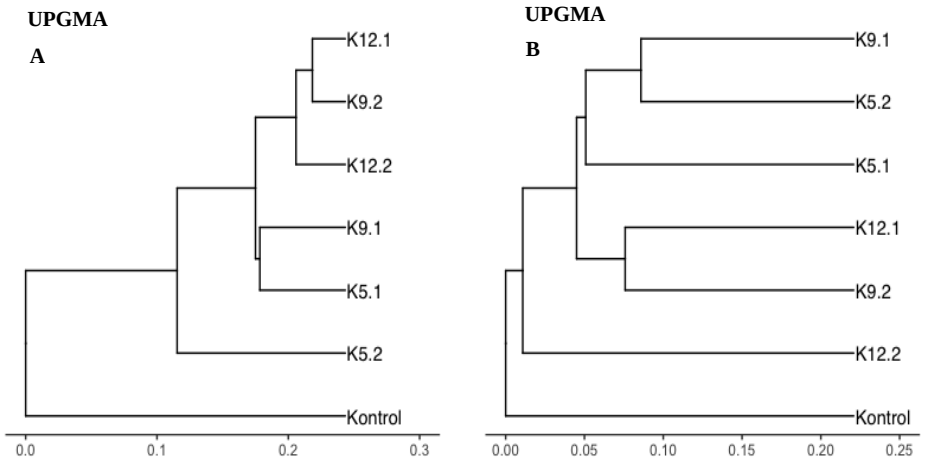
P. khinjuk × *P. atlantica* genotipine ait klonlardan ISSR primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.24.) ve dendogram (Şekil 4.44.A.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.49 ile 0.95 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.74 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna en yakın klon K12-1 (12.ay) klonudur. Kontrol grubuna en uzak klon ise K5-2 (5.ay) bireyidir. Klonların birbirleri arasındaki benzerlik oranları değerlendirildiğinde ise; birbirine en yakın iki klonun K12-1 bireyi ile K9-2 bireyi olduğu, birbirine en uzak klonların ise K5-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.25. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değerleri

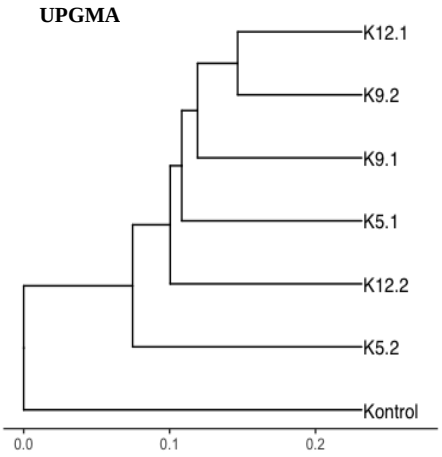
	Kontrol	K5-1	K5-2	K9-1	K9-2	K12-1	K12-2
Kontrol	1						
K5-1	0.58	1					
K5-2	0.55	0.67	1				
K9-1	0.55	0.65	0.73	1			
K9-2	0.56	0.63	0.62	0.69	1		
K12-1	0.58	0.67	0.63	0.65	0.71	1	
K12-2	0.53	0.57	0.52	0.56	0.57	0.68	1

P. khinjuk × *P. atlantica* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.25.) ve dendogram (Şekil 4.44.B.) irdelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.52 ile 0.73 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.61 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna en yakın klon K9-1 (9.ay) klonudur. Kontrol grubuna

en uzak klon ise K12-2 (12.ay) bireyidir. Klonların birbirleri arasındaki benzerlik oranları değerlendirildiğinde ise; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-2 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.44. A. ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram
B. IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram

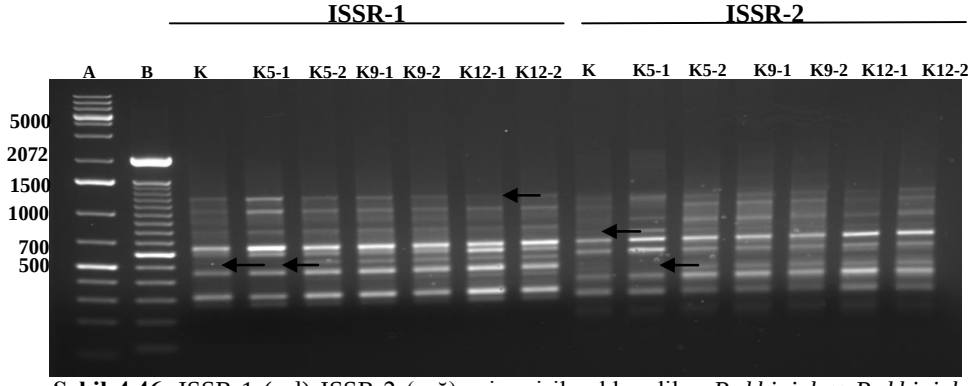


Şekil 4.45. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram

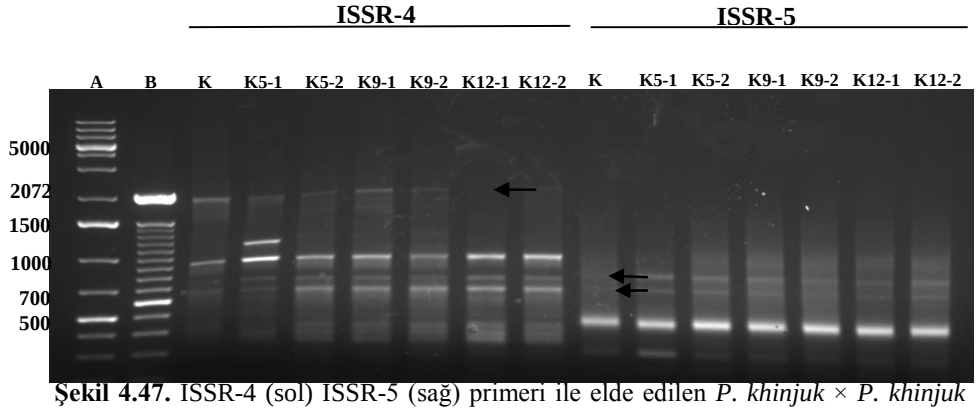
P. khinjuk × *P. atlantica* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.45.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K12-1 ile K9-2 bireylerinin olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise Kontrol ile K12-1 bireyidir.

4.12.2.2. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

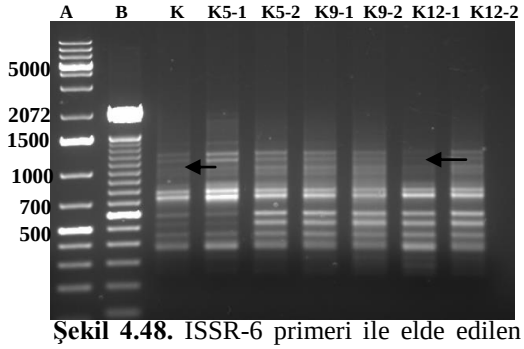
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* genotipi için gerçekleştirilen ISSR - IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla Şekil 4.46., 4.47., 4.48., 4.49., 4.50., 4.51. ve 4.52.'de görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR – PCR ve IRAP - PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



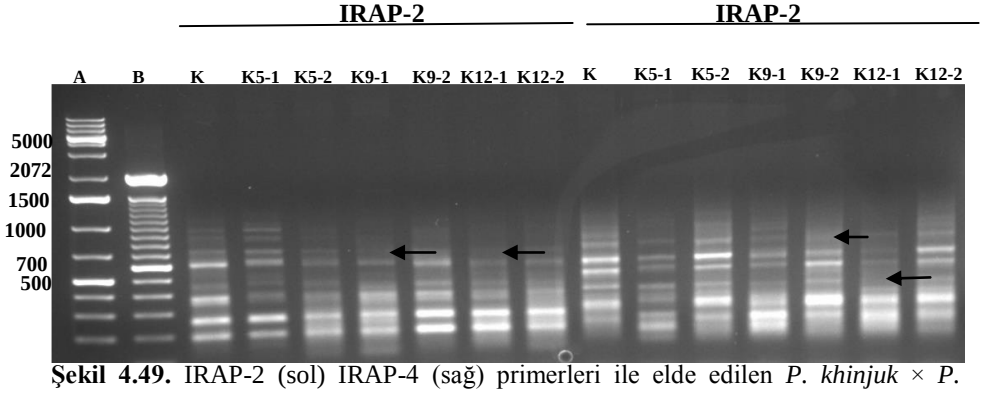
Şekil 4.46. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



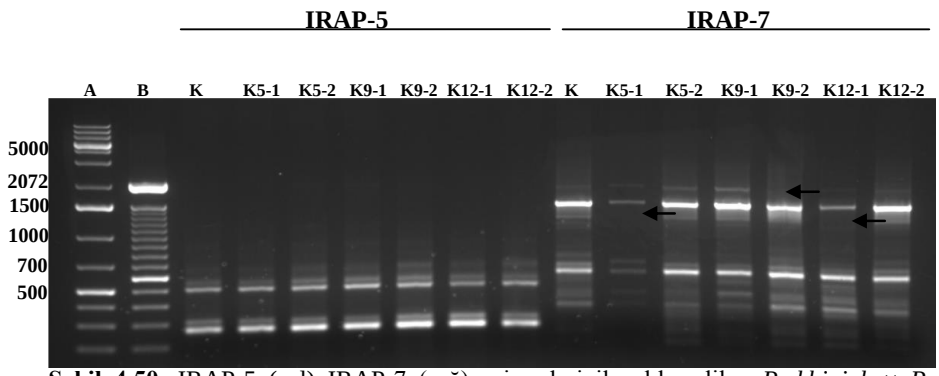
Şekil 4.47. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



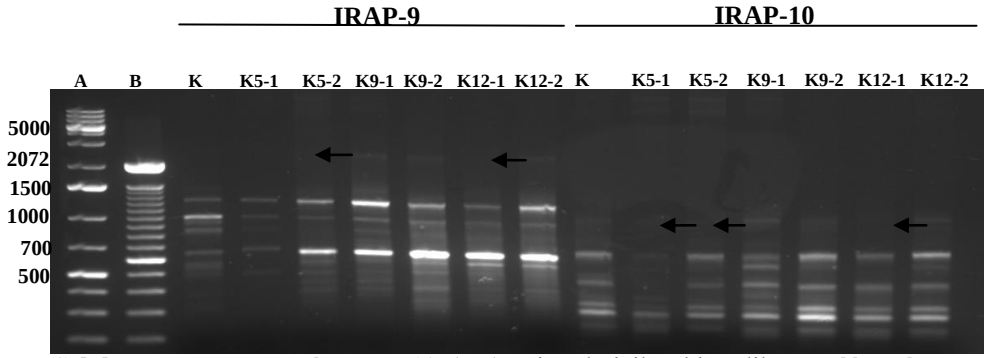
Şekil 4.48. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* ISSR profili (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



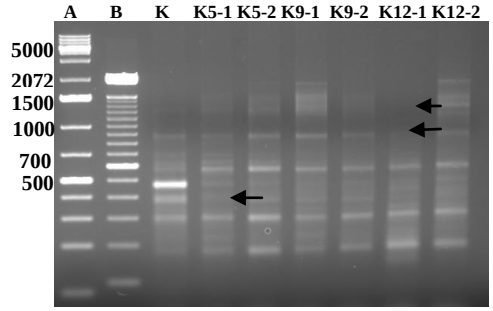
Şekil 4.49. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.50. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.51. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.52. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. khinjuk* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

Çizelge 4.26. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	280-1200	10	3	30.0	0.11
ISSR-2	200-2700	14	7	50.0	0.17
ISSR-4	200-2070	16	11	68.75	0.23
ISSR-5	250-950	7	3	42.85	0.16
ISSR-6	250-1272	16	6	37.50	0.13
Toplam		**63**	**30**		
Ortalama				**45.76**	**0.160**
IRAP-2	150-1000	9	4	44.4	0.19
IRAP-4	200-1050	10	5	50.0	0.16
IRAP-5	280-880	6	1	16.66	0.08
IRAP-7	200-2000	12	6	50.0	0.2
IRAP-9	350-2800	11	8	72.72	0.3
IRAP-10	280-1000	8	5	62.50	0.18
AYF2	180-1200	11	6	54.54	0.18
Toplam		**67**	**35**		
Ortalama				**50.11**	**0.184**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

P. khinjuk × *P. khinjuk* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve yüzdesi, PIC değerleri Çizelge 4.26.'da gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 180 bç'den 2.8 kb büyüklüğüne

kadar toplam 130 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 7-16 arasında olmak üzere toplam 63 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 30'u (%47.61) polimorfik olarak belirlenmiştir. IRAP primerleri için 6-12 arasında olmak üzere toplam 67 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 35'i (%52.23) polimorfik olarak belirlenmiştir. En çok polimorfizm oranı, IRAP-9 ve ISSR-4 primerleri ile %72.72 ve %68.75 amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm ISSR-1 primeri ile %30.0 olarak ölçüldü. ISSR primerleri ile elde edilen PIC değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek PIC değeri 0.23 ile en çok polimorfik bant veren primer ISSR-4 primeri olurken, en düşük PIC değeri 0.11 ile ISSR-1 primeridir. Tüm ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.160 olarak hesaplandı. IRAP primerleri ile elde edilen PIC değerleri karşılaştırıldığında; en yüksek PIC değeri 0.3 ile en çok polimorfik bandı IRAP-9 primeri ile elde edilirken, en düşük PIC değeri 0.16 ile IRAP-4 primeri ile elde edildi. Tüm IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.184 olarak hesaplandı (Çizelge 4.26.).

Çizelge 4.27. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	**ISSR-2**	**ISSR-4**	**ISSR-5**	**ISSR-6**	**Ortalama**
nP*	3	7	11	3	6	6
nM**	7	7	5	4	10	6.6
nL***	10	14	16	7	16	12.6
pP****	0.3	0.5	0.69	0.43	0.38	0.46

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

5 farklı ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.27.) değerlendirildiğinde *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonunda ISSR-4 primeri ile 11 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise ISSR-5 ve ISSR-1 primerleri ile 3'er bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 6'dir. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 10 bant ile ISSR-6 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-5 ile 4 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 6.6 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.69 ile ISSR-4 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.3 ile ISSR-1 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.46 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.28. *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	IRAP-4	IRAP-5	IRAP-7	IRAP-9	IRAP-10	AYF2	Ortalama
nP*	4	5	1	6	8	5	6	5.429
nM**	5	5	5	6	3	3	5	4.571
nL***	9	10	6	12	11	8	11	9.571
pP******	0.44	0.5	0.17	0.5	0.73	0.62	0.55	0.5014

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.28.) değerlendirildiğinde *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonunda IRAP-9 ve AYF2 primeri ile 8 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise IRAP-5 primeri ile 1 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerinin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 5.429'dur. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 6 bant ile IRAP-7 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-9 ve IRAP-10 primeri ile 3 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 4.571 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.73 ile IRAP-9 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.17 ile IRAP-5 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.5014 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.29. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	K5-1	K5-2	K9-1	K9-2	K12-1	K12-2
Kontrol	1						
K5-1	0.72	1					
K5-2	0.63	0.72	1				
K9-1	0.63	0.72	1	1			
K9-2	0.62	0.71	0.91	0.91	1		
K12-1	0.65	0.75	0.81	0.81	0.87	1	
K12-2	0.62	0.71	0.87	0.87	0.89	0.87	1

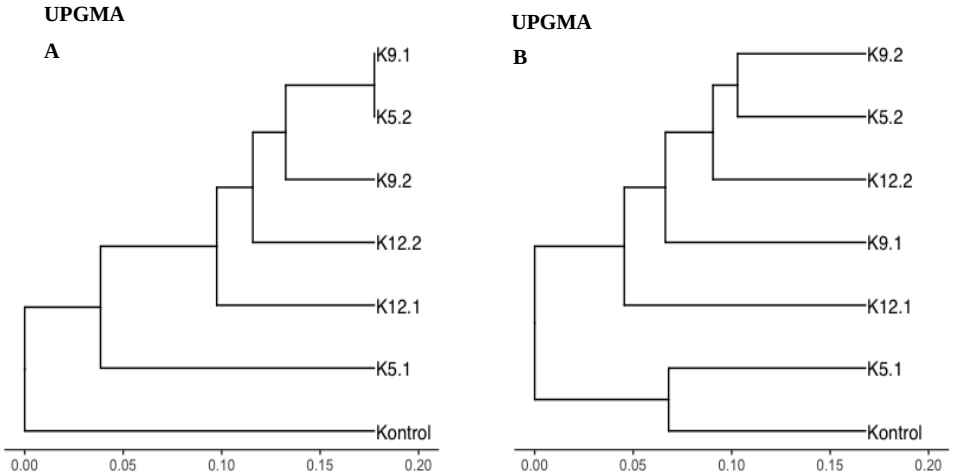
P. khinjuk × *P. khinjuk* genotipine ait klonlardan ISSR primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.29.) ve dendogram (Şekil 4.53.A) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.62 ile 1 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.77 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-2) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak

klon ise K9-2 (9.ay) bireyidir. Klonların birbirleri arasındaki benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-2 bireyi ile K5-2 ve K9-1 bireyleri olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K9-2 bireyi ile Kontrol ve K12-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.

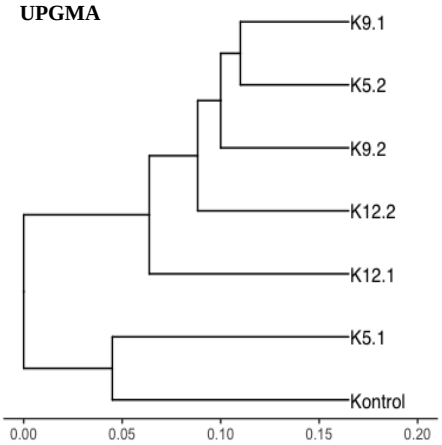
Çizelge 4.30. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. khinjuk* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.80	1					
K5-2	0.68	0.67	1				
K9-1	0.66	0.68	0.80	1			
K9-2	0.71	0.67	0.87	0.81	1		
K12-1	0.59	0.60	0.79	0.71	0.77	1	
K12-2	0.75	0.63	0.84	0.78	0.85	0.75	1

P. khinjuk × *P. khinjuk* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.30.) ve dendogram (Şekil 4.53.B) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.59 ile 0.87 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.73 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 12. ay klonu (K12-2) olmuştur. Kontrol grubu ile arasında en yüksek varyasyon gösteren klon ise K12-1 (12.ay) bireyidir. IRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların birbirleri ile olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K5-2 ile K9-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-1 bireyi ile kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.53. **A**. ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram
B. IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

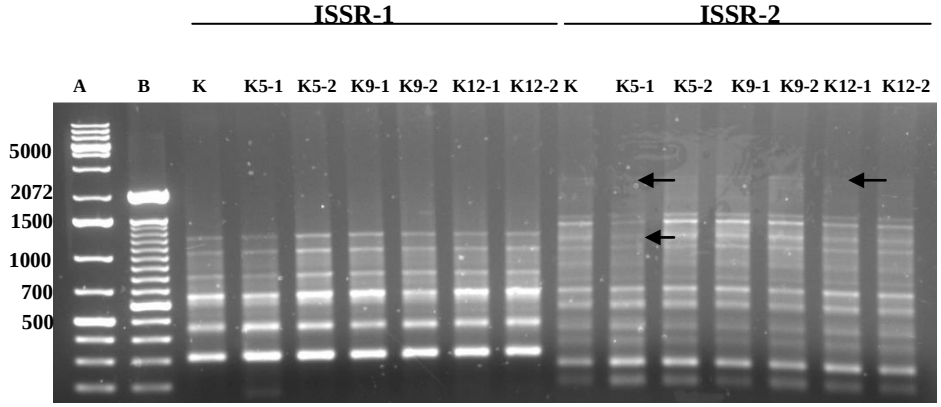


Şekil 4.54. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. khinjuk* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

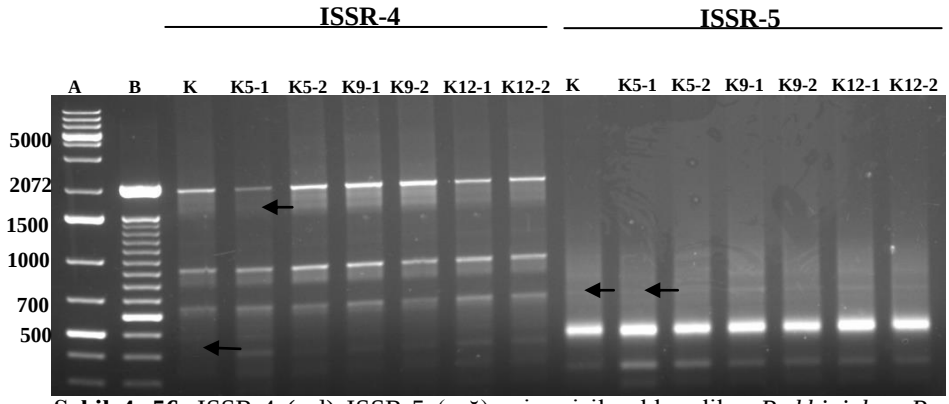
P. khinjuk × *P. khinjuk* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.54.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K5-1 ile K9-2 ve K5-1 ile Kontrol grubu olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise Kontrol ve K5-1 ile K9-1 bireyidir.

4.12.2.3. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

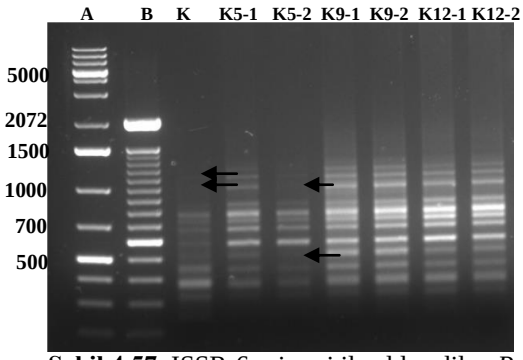
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotipi için yapılan ISSR - IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.55., 4.56., 4.57., 4.58., 4.59., 4.60. ve 4.61.**'de görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR – IRAP PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



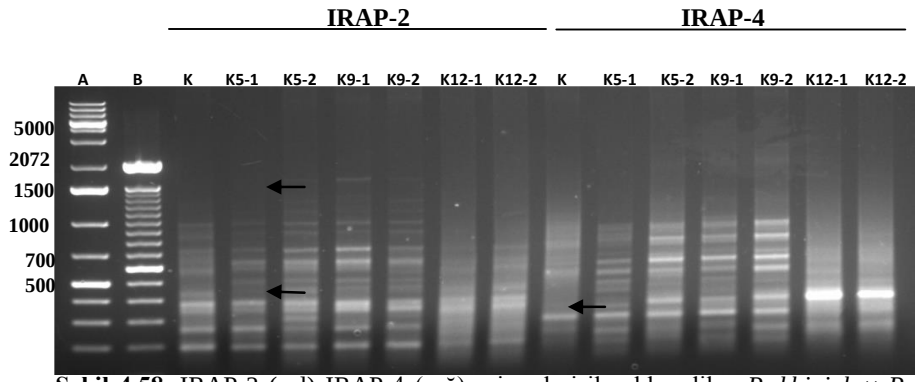
Şekil 4.55. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



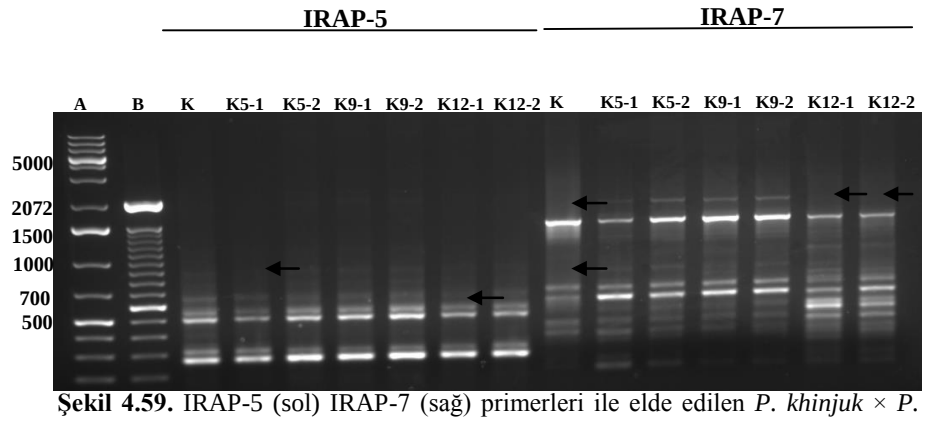
Şekil 4. 56. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



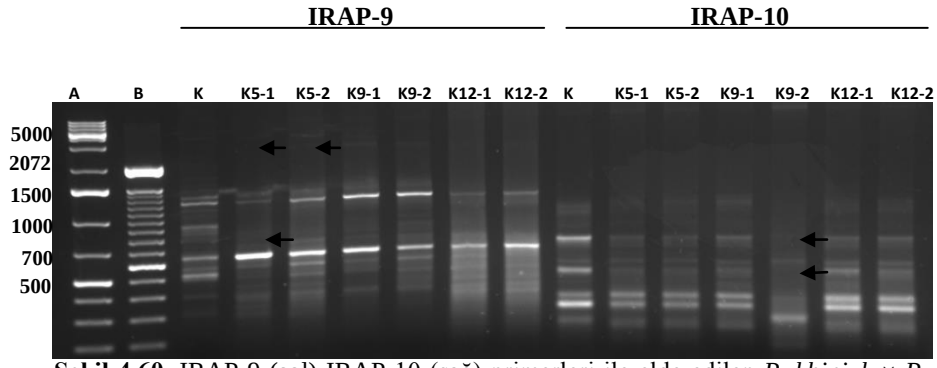
Şekil 4.57. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* ISSR profili (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2:** 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



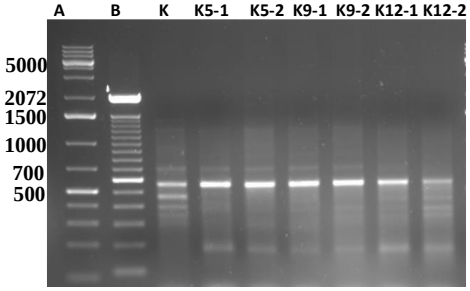
Şekil 4.58. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.59. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.60. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.61. AYF2 primeri ile elde edilen *P. khinjuk* × *P. terebinthus* profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

P. khinjuk × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve yüzdesi, PIC değerleri Çizelge 4.31.'de gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 180 bç'den 2.1 kb büyüklüğüne kadar toplam 136 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 6-13 arasında olmak üzere toplam 53 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 8'i (%15.09) polimorfik olarak belirlenmiştir. IRAP primerleri için 8-14 arasında olmak üzere toplam 83 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 62'isi (%74.69) polimorfik olarak belirlenmiştir En çok polimorfizm oranı, IRAP-4 ve AYF2 primerleri ile %92.85 ve %88.88 amplifikasyon

sırasında görülürken, en düşük polimorfizm ISSR-4 ve ISSR-5 primeri ile %0.0 olarak ISSR-2 ile %7.69 olarak ölçüldü. ISSR primerleri ile elde edilen PIC değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek PIC değeri 0.13 ile en çok polimorfik bant veren birey sayısı ISSR-6 primeri ile elde edilirken, en düşük PIC değeri 0 ile ISSR-4 ve ISSR-5 primerleri ile edildi. Tüm ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.056 olarak hesaplandı. IRAP primerleri ile elde edilen PIC değerleri karşılaştırıldığında; en yüksek PIC değeri 0.36 ile en çok polimorfik bant veren birey sayısı IRAP-4 primeri ile elde edilirken, en düşük PIC değeri 0.15 ise IRAP-5 primeri ile elde edildi. Tüm IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.272 olarak hesaplandı (Çizelge 4.31.).

Çizelge 4.31. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	180-1300	10	3	30.0	0.12
ISSR-2	250-2100	13	1	7.69	0.03
ISSR-4	180-2072	10	0	0	0
ISSR-5	280-900	6	0	0	0
ISSR-6	250-1300	14	4	28.57	0.13
Toplam		**53**	**8**		
Ortalama				**13.52**	**0.056**
IRAP-2	200-1800	14	11	78.57	0.33
IRAP-4	200-1000	14	13	92.85	0.36
IRAP-5	280-950	8	3	37.50	0.15
IRAP-7	250-2000	13	8	61.53	0.26
IRAP-9	300-1400	14	10	71.42	0.23
IRAP-10	200-1300	11	9	81.81	0.22
AYF2	200-1300	9	8	88.88	0.36
Toplam		**83**	**62**		
Ortalama				**73.22**	**0.272**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

Çizelge 4.32. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	ISSR-2	ISSR-4	ISSR-5	ISSR-6	Ortalama
nP*	3	1	0	0	4	1.6
nM**	7	12	10	6	10	9
nL***	10	13	10	6	14	10.6
pP****	0.3	0.08	0	0	0.29	0.134

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

5 farklı ISSR primerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.32.) değerlendirildiğinde *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonunda ISSR-6 primeri ile 4 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. ISSR-4 ve ISSR-5 primerleri ile hiç polimorfik bant kaydedilemiştir. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 1.6'dır. En fazla monomorfik bant elde edilen belirteç ise 12 bant ile ISSR-2 belirteci olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-5 ile 6 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 9 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.3 ile ISSR-1 primer ile elde edilirken, ISSR-4 ve ISSR-5 primerlerinde polimorfik lokus oranı 0 olarak kaydedilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.134 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.33. *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	**IRAP-4**	**IRAP-5**	**IRAP-7**	**IRAP-9**	**IRAP-10**	**AYF2**	**Ortalama**
nP*	11	13	3	8	10	9	8	8.857
nM**	3	1	5	5	4	2	1	3
nL***	14	14	8	13	14	11	9	11.86
pP****	0.79	0.93	0.38	0.62	0.71	0.84	0.89	0.7343

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.33.) değerlendirildiğinde *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonunda IRAP-2 ve IRAP-4 primerleri ile 11 ve 13 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise IRAP-5 primeri ile 3 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 8.857'dir. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 5 bant ile IRAP-5 ve IRAP-7 primerleri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-4 ve AYF2 primerleri ile 1 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 3 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.33 ile IRAP-4 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.38 ile IRAP-5 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.7343 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.34. ISSR primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değerleri

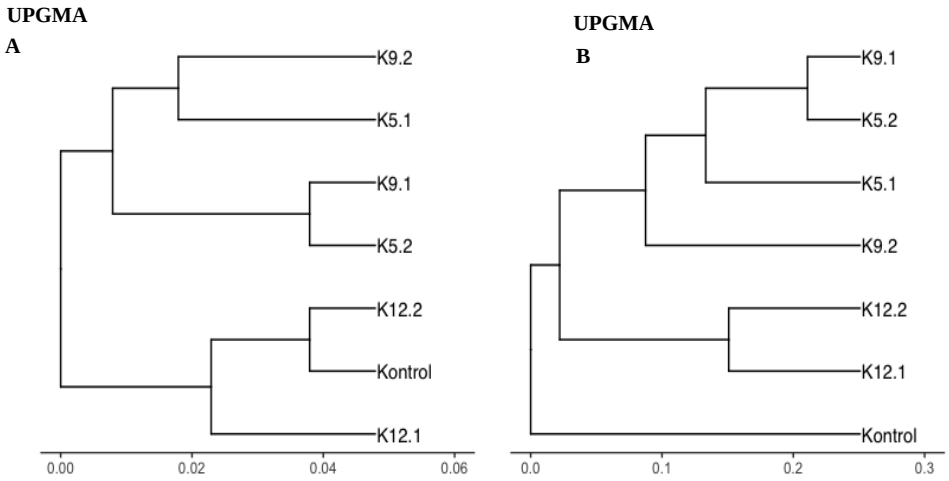
	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.92	1					
K5-2	0.90	0.90	1				
K9-1	0.88	0.92	0.98	1			
K9-2	0.90	0.94	0.92	0.94	1		
K12-1	0.94	0.87	0.92	0.90	0.92	1	
K12-2	0.98	0.90	0.92	0.90	0.92	0.96	1

P. khinjuk × *P. terebinthus* genotipine ait klonlardan ISSR primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.34.) ve dendogram (Şekil 4.62.A.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.87 ile 0.98 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.92 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-1) ve 12. ay klonu (K2-2) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise K9-1 (9.ay) bireyidir. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K5-2 bireyi ve aynı benzerlik oranına sahip olan diğer iki klon ise K12-2 ve Kontrol grubu olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-1 bireyi ile K5-1 bireyi arasında olduğu görülmüştür.

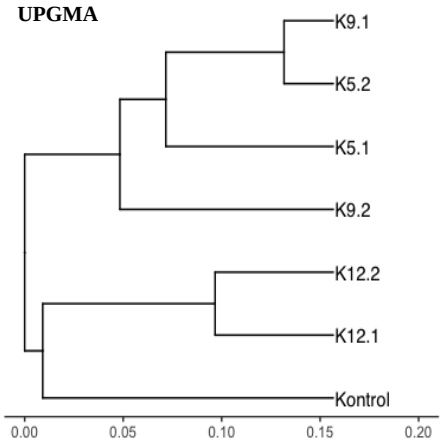
Çizelge 4.35. IRAP primerleri kullanılarak *P. khinjuk* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.52	1					
K5-2	0.51	0.79	1				
K9-1	0.49	0.74	0.92	1			
K9-2	0.44	0.64	0.70	0.68	1		
K12-1	0.48	0.55	0.57	0.57	0.48	1	
K12-2	0.55	0.57	0.56	0.54	0.50	0.80	1

P. khinjuk × *P. terebinthus* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.35.) ve dendogram (Şekil 4.62.B.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.44 ile 0.92 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.6 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-1) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise K9-2 (9.ay) bireyidir. IRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K9-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.62. **A.** ISSR primerleri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram.
B. IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

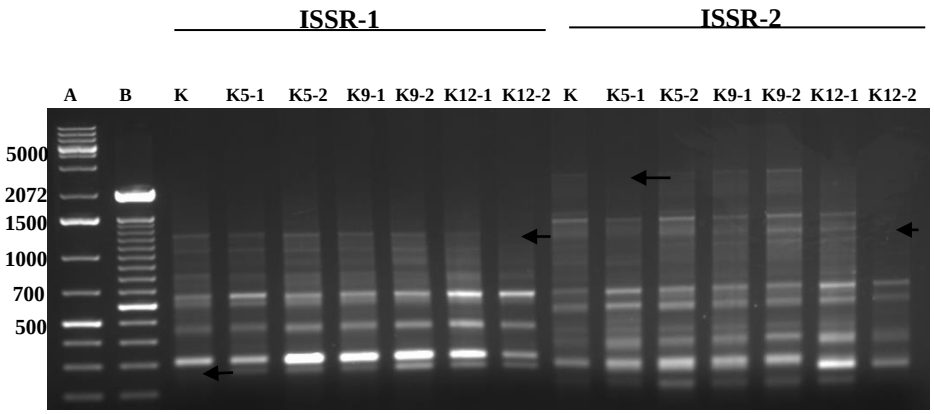


Şekil 4.63. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. khinjuk* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

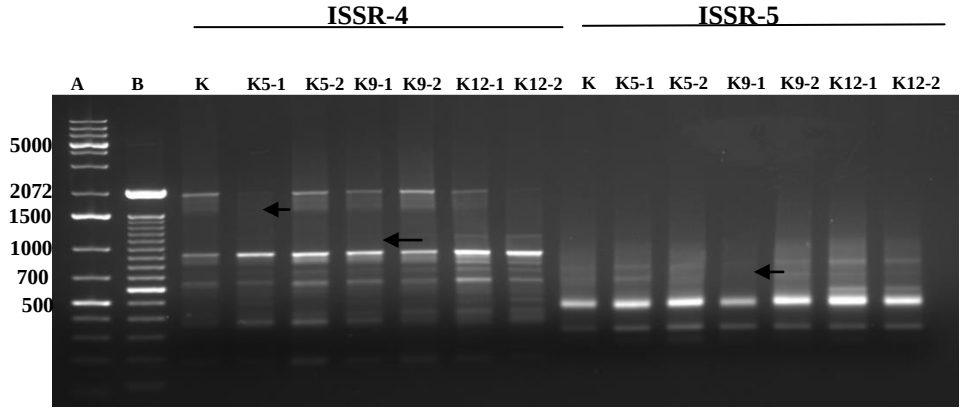
P. khinjuk × *P. terebinthus* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.63.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K12-1 ile K12-2 ve K9-1 ile K5-2 bireylerinin olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise Kontrol ile K9-1 bireyidir.

4.12.2.4. *P. vera* × *P. atlantica* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

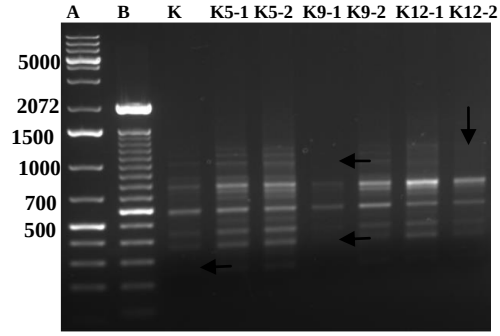
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. vera* × *P. atlantica* genotipi için yapılan ISSR - IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.64., 4.65., 4.66., 4.67., 4.68., 4.69. ve 4.70.**'de görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR – IRAP PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



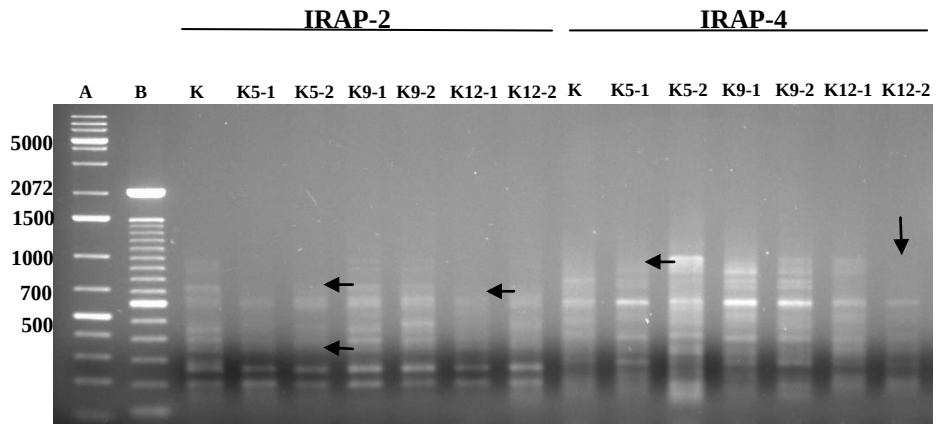
Şekil 4.64. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



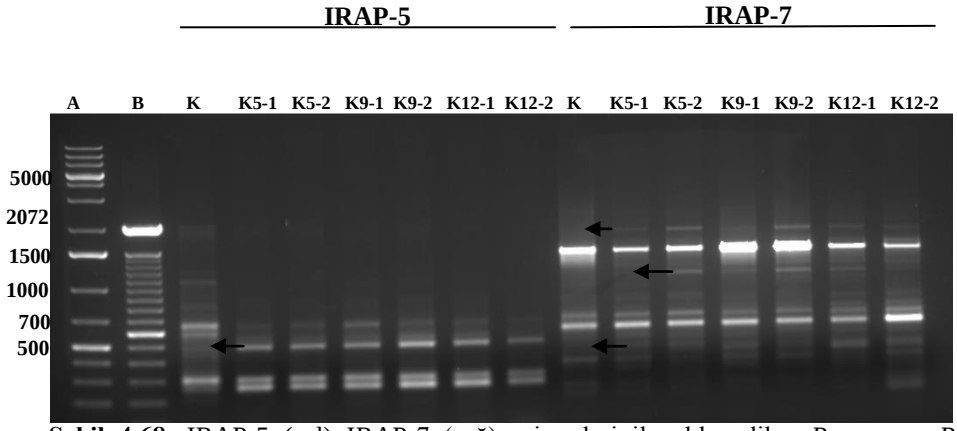
Şekil 4.65. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2:** 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



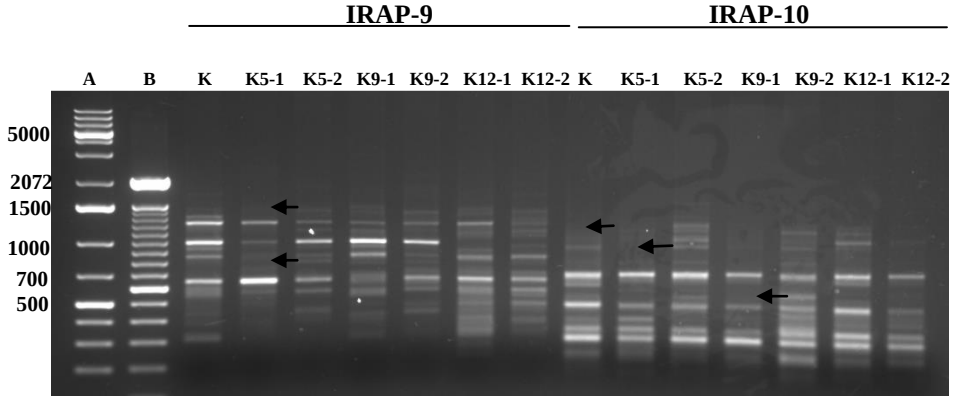
Şekil 4.66. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



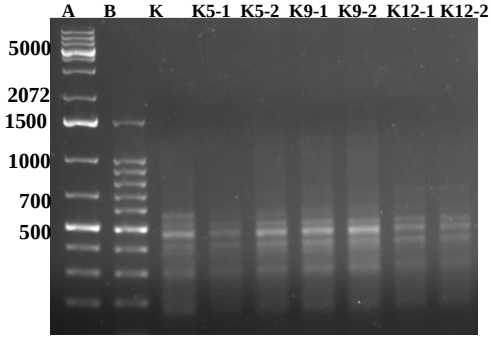
Şekil 4.67. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.68. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.69. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* IRAP profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.70. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. atlantica* profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

Çizelge 4.36. *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	290-1250	9	4	44.4	0.13
ISSR-2	200-2800	13	8	61.5	0.24
ISSR-4	200-2072	13	8	61.5	0.26
ISSR-5	300-830	6	3	50.0	0.18
ISSR-6	280-1200	13	10	76.9	0.31
Toplam		**54**	**33**		
Ortalama				**58.86**	**0.224**
IRAP-2	200-1000	9	4	44.4	0.2
IRAP-4	180-1000	10	6	60.0	0.26
IRAP-5	230-2100	13	10	76.9	0.24
IRAP-7	230-2072	14	6	42.9	0.15
IRAP-9	280-1800	20	15	75.0	0.31
IRAP-10	200-1600	14	9	64.3	0.26
AYF2	180-700	7	2	28.6	0.13
Toplam		**87**	**52**		
Ortalama				**56.01**	**0.221**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

P. vera × *P. atlantica* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve yüzdesi, PIC değerleri Çizelge 4.36.'de gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 180 bç'den 2.8 kb büyüklüğüne kadar toplam 141 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 6-13 arasında olmak üzere toplam 54 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 33'ü (%61.11) polimorfik olarak belirlenmiştir. IRAP primerleri için 7-20 arasında olmak üzere toplam 87 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 52'si (%59.77) polimorfik olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı, ISSR-6 ve IRAP-5 primerleri ile %76.9 amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm AYF2 primeri ile %28.6 olarak olarak ölçüldü. PIC değerleri karşılaştırıldığında ise ISSR primerleri için en yüksek PIC değeri yani en çok polimorfik bant elde edilen primer 0.31 ile ISSR-6 primeri oldu. En düşük PIC değerini 0.13 ile ISSR-1 primerinden elde edildi. ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.224 olarak hesaplandı. IRAP primerleri için PIC değerleri karşılaştırıldığında en yüksek PIC değeri 0.31 ile IRAP-9 primeri olurken, en düşük PIC değerini 0.15 ile IRAP-7 primeri verdi. IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.221 olarak hesaplandı. (Çizelge 4.36.).

Çizelge 4.37. *P. vera* × *P. atlantica* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	**ISSR-2**	**ISSR-4**	**ISSR-5**	**ISSR-6**	**Ortalama**
nP*	4	8	8	3	9	6.4
nM**	5	5	5	3	3	4.2
nL***	9	13	13	6	12	10.6
pP****	0.44	0.62	0.62	0.5	0.75	0.586

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

5 farklı ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.37.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. atlantica* klonunda ISSR-6 primeri ile 9 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant veren primerler ise 3 bant ile ISSR-5 primeri olmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 6.4'dür. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 5'er bant ile ISSR-1, ISSR-2 ve ISSR-4 primerleri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primerler ise ISSR-5 ve ISSR-6 ile 3'er bant olarak bulunmuştur. Ortalama

monomorfik bant oranı 4.2 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.75 ile ISSR-6 primeri ile elde edilirken, ISSR-1 primerinde polimorfik lokus oranı 0.44 ile en düşük oran olarak kaydedilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.586 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.38. *P. vera* × *P. atlantica* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	**IRAP-4**	**IRAP-5**	**IRAP-7**	**IRAP-9**	**IRAP-10**	**AYF2**	**Ortalama**
nP*	4	6	10	6	15	9	2	7.429
nM**	5	4	3	8	5	5	5	5
nL***	9	10	13	14	20	14	7	12.43
pP******	0.44	0.6	0.77	0.43	0.75	0.64	0.29	0.56

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.38.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. atlantica* klonunda IRAP-5 ve IRAP-9 primerleri ile 10 ve 15 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise AYF2 primeri ile 2 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 7.429'dur. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 8 bant ile IRAP-7 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-5 primeri ile 3 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 5 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.77 ile IRAP-5 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.29 ile AYF2 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.7343 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.39. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değerleri

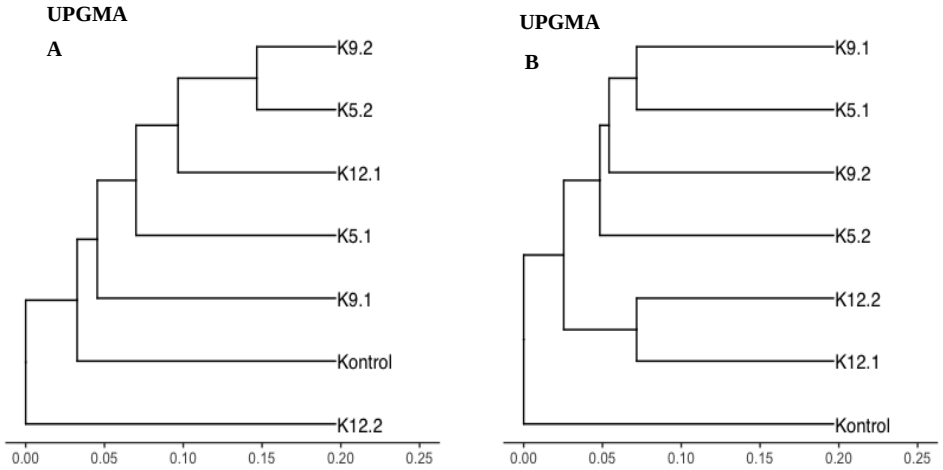
	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.70	1					
K5-2	0.68	0.78	1				
K9-1	0.69	0.59	0.76	1			
K9-2	0.69	0.73	0.90	0.75	1		
K12-1	0.60	0.73	0.81	0.69	0.79	1	
K12-2	0.55	0.59	0.58	0.57	0.62	0.73	1

P. vera × *P. atlantica* genotipine ait klonlardan ISSR primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.39.) ve dendogram (Şekil 4.71.A.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.55 ile 0.90 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.69 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-2) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise 12. ay (K12-2) bireyidir. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-2 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.

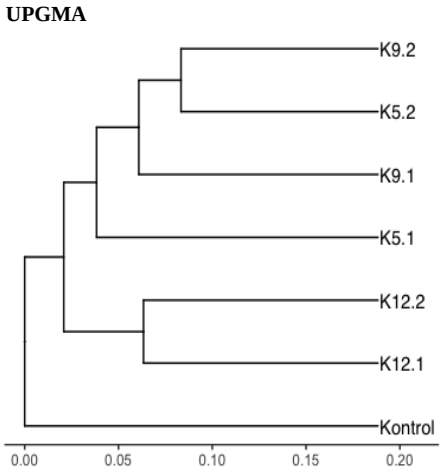
Çizelge 4.40. IRAP primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. atlantica* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.61	1					
K5-2	0.59	0.68	1				
K9-1	0.64	0.75	0.72	1			
K9-2	0.64	0.68	0.71	0.75	1		
K12-1	0.57	0.67	0.65	0.65	0.65	1	
K12-2	0.59	0.71	0.66	0.65	0.61	0.75	1

P. vera × *P. atlantica* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.40.) ve dendogram (Şekil 4.71.B.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.57 ile 0.75 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.66 olarak belirlendi. Kontrol grubuna genetik olarak en yakın klon 9. ay klonu (K9-2) olmuştur. Kontrol grubu ile aralarında en yüksek varyasyon olan klon ise 12. ay (K12-1) bireyidir. IRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K5-1 bireyi ve K9-1 ile K9-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-1 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.71. A. ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram
B. IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

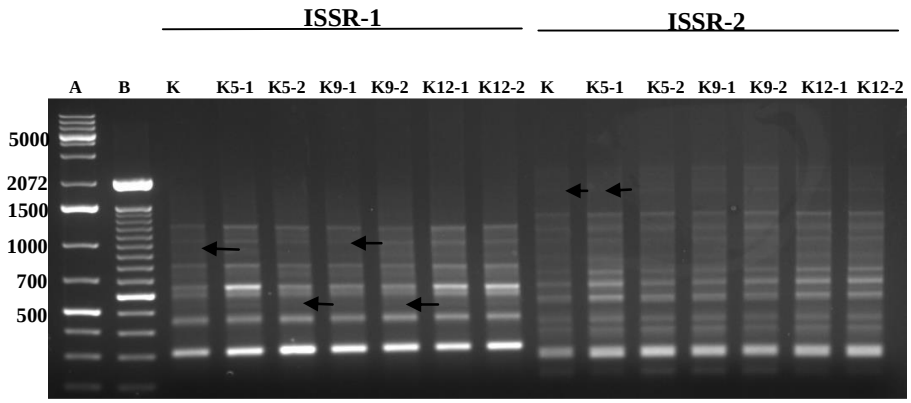


Şekil 4.72. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. atlantica* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

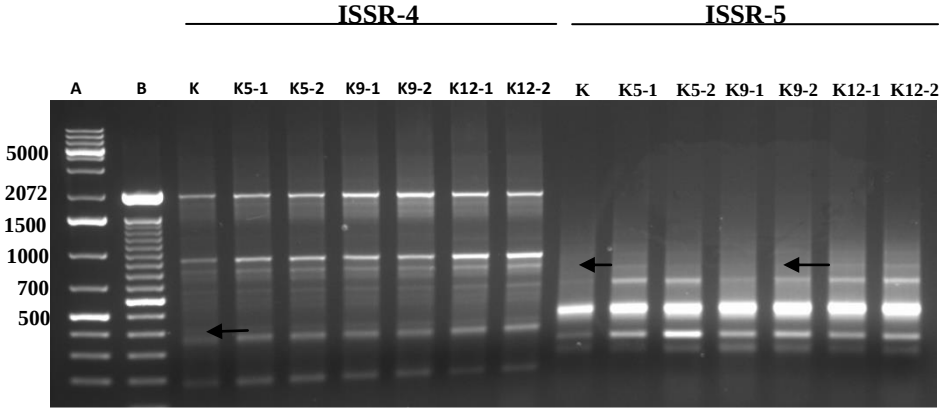
P. vera × *P. atlantica* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.72.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K12-1 ile K12-2 ve K9-2 ile K5-2 bireylerinin olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise Kontrol ile K9-2 bireyidir.

4.12.2.5. *P. vera* × *P. vera* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

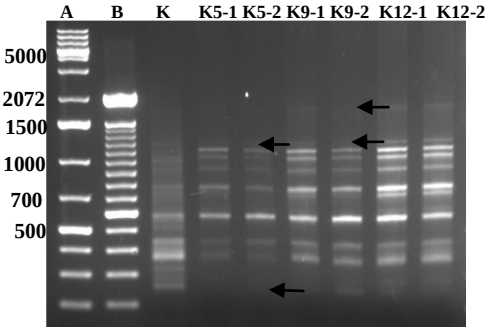
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. vera* × *P. vera* genotipi için yapılan ISSR - IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.73., 4.74., 4.75., 4.76., 4.77., 4.78. ve 4.79.**'de görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR - IRAP PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



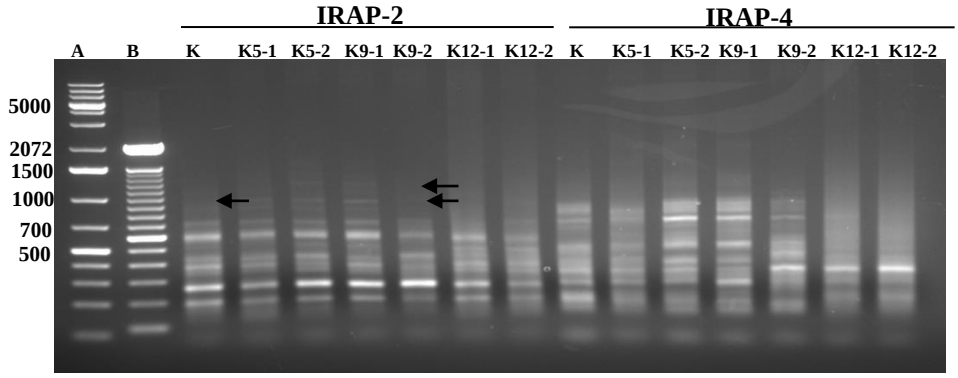
Şekil 4.73. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



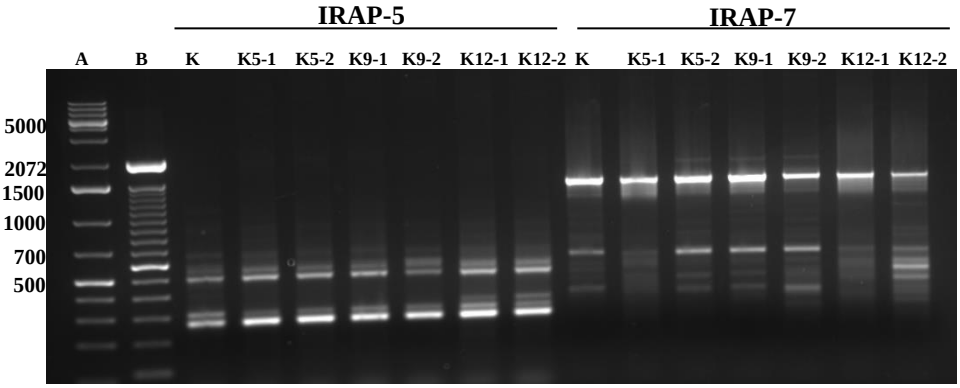
Şekil 4.74. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1:** 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



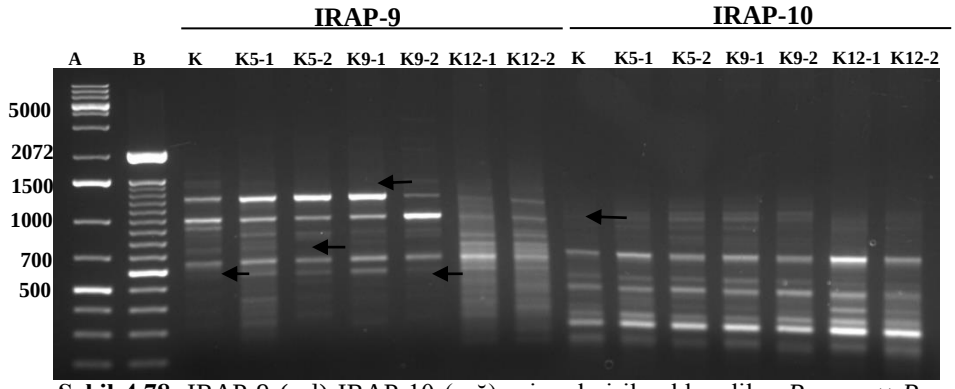
Şekil 4.75. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* ISSR profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2:** 12. ayın 2. örneği



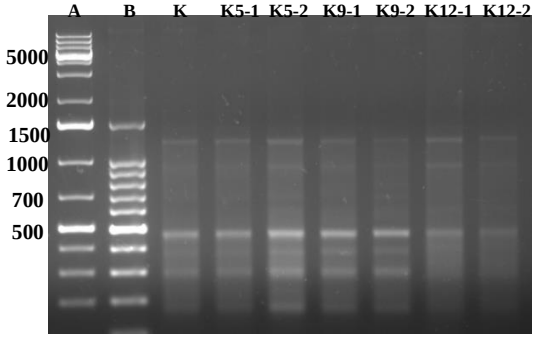
Şekil 4.76. IRAP-2 (sol) IRAP-4 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A:** 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K:** Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1:** 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.77. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B:** 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1:** 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.78. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel)**: A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.79. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. vera* profilleri (%1.5'luk agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

P. vera × *P. vera* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve yüzdesi, PIC değerleri Çizelge 4.41.'de gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 100 bç'den 2.6 kb büyüklüğüne kadar toplam 138 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 5-16 arasında olmak üzere toplam 55 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 19'u (%34.54) polimorfik olarak belirlenmiştir. IRAP primerleri için 8-15 arasında olmak üzere toplam 83 bant elde edilmiş olup, bu

bantlardan 51'i (%61.44) polimorfik olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı, IRAP-7 ve IRAP-9 primerleri ile % 80.0 ve %73.33 amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm ISSR-4 primeri ile % 14.28 olarak olarak ölçüldü. PIC değerleri karşılaştırıldığında ise ISSR primerleri için en yüksek PIC değeri yani en çok polimorfik bant elde edilen primer 0.25 ile ISSR-6 primeri oldu. En düşük PIC değerini 0.05 ile ISSR-4 primerinden elde edildi. ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.12 olarak hesaplandı. IRAP primerleri için PIC değerleri karşılaştırıldığında en yüksek PIC değeri 0.32 ile IRAP-7 ve IRAP-9 primerleri olurken, en düşük PIC değerini 0.19 ile IRAP-2 ve IRAP-5 primeri verdi. IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.232 olarak hesaplandı (Çizelge 4.41.).

Çizelge 4.41. *P. vera* × *P. vera* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	300-1200	8	2	25.0	0.09
ISSR-2	250-2600	12	3	25.0	0.11
ISSR-4	180-2072	14	2	14.28	0.05
ISSR-5	350-900	5	1	20.0	0.1
ISSR-6	250-2072	16	11	68.75	0.25
Toplam		**55**	**19**		
Ortalama				**30.60**	**0.120**
IRAP-2	200-1400	13	7	53.84	0.19
IRAP-4	200-1400	10	7	70.0	0.24
IRAP-5	200-1100	11	5	45.45	0.19
IRAP-7	100-2072	15	12	80.0	0.32
IRAP-9	250-1500	15	11	73.33	0.32
IRAP-10	280-1300	11	6	54.54	0.24
AYF2	180-1300	8	3	37.50	0.13
Toplam		**83**	**51**		
Ortalama				**59.23**	**0.232**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

Çizelge 4.42. *P. vera* × *P. vera* melezinde ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	ISSR-2	ISSR-4	ISSR-5	ISSR-6	Ortalama
nP*	2	3	2	1	11	3.8
nM**	6	9	12	4	5	7.2
nL***	8	12	14	5	16	11
pP****	0.25	0.25	0.14	0.2	0.69	0.306

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

5 farklı ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.42.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. vera* klonunda ISSR-6 primeri ile 11 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant veren primer ise 1 bant ile ISSR-5 primerleri olmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 3.8'dir. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-4 primeri ile 12 banttır. En az monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-5 primerinde 4 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 7.2 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.69 ile ISSR-6 primeri ile elde edilirken, ISSR-4 primerinde polimorfik lokus oranı 0.14 ile en düşük oran olarak kaydedilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.306 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.43. *P. vera* × *P. vera* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	**IRAP-4**	**IRAP-5**	**IRAP-7**	**IRAP-9**	**IRAP-10**	**AYF2**	**Ortalama**
nP*	7	7	5	12	11	6	3	7.286
nM**	6	3	6	3	4	5	5	4.571
nL***	13	10	11	15	15	11	8	11.86
pP****	0.54	0.7	0.45	0.8	0.73	0.55	0.38	0.5929

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.43.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. vera* klonunda IRAP-5 ve IRAP-9 primerleri ile 10 ve 15 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise AYF2 primeri ile 2 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 7.429'dur. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 8 bant ile IRAP-7 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-5 primeri ile 3 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 5 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.77 ile IRAP-5 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.29 ile AYF2 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.7343 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.44. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. vera* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.81	1					
K5-2	0.83	0.85	1				
K9-1	0.76	0.75	0.88	1			
K9-2	0.83	0.85	1	0.88	1		
K12-1	0.74	0.79	0.81	0.88	0.81	1	
K12-2	0.73	0.81	0.83	0.87	0.83	0.98	1

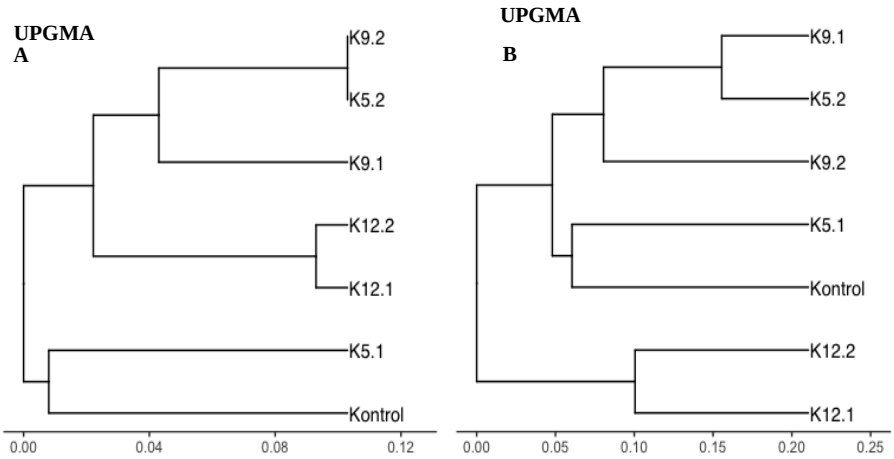
P. vera × *P. vera* genotipine ait klonlardan ISSR primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.44.) ve dendogram (Şekil 4.80.A.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.73 ile 0.98 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.83 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 12. ay klonu ve 9. ay klonu olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise 12. ay klonu (K12-1) bireyidir. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-2 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.45. IRAP primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. vera* klonlarının benzerlik değerleri

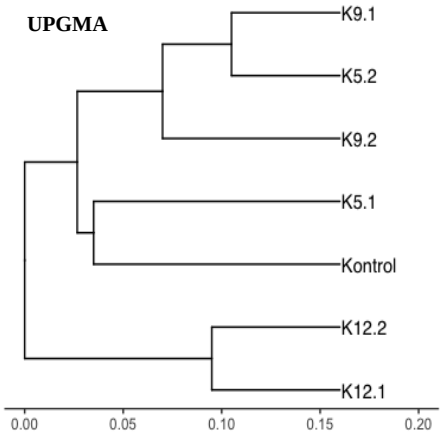
	Kontrol	**K5-1**	**K5-2**	**K9-1**	**K9-2**	**K12-1**	**K12-2**
Kontrol	1						
K5-1	0.70	1					
K5-2	0.62	0.68	1				
K9-1	0.68	0.70	0.89	1			
K9-2	0.70	0.67	0.71	0.77	1		
K12-1	0.61	0.62	0.59	0.54	0.55	1	
K12-2	0.61	0.63	0.55	0.55	0.54	0.78	1

P. vera × *P. vera* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.45.) ve dendogram (Şekil 4.80.B.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.54 ile 0.89

arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.65 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-1) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise 12. ay (K12-1 ve K12-2) bireyidir. IRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-1 ile K9-1 bireyi ve ile K12-2 ile K9-2 bireyi arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.80. **A.** ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram
B. IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

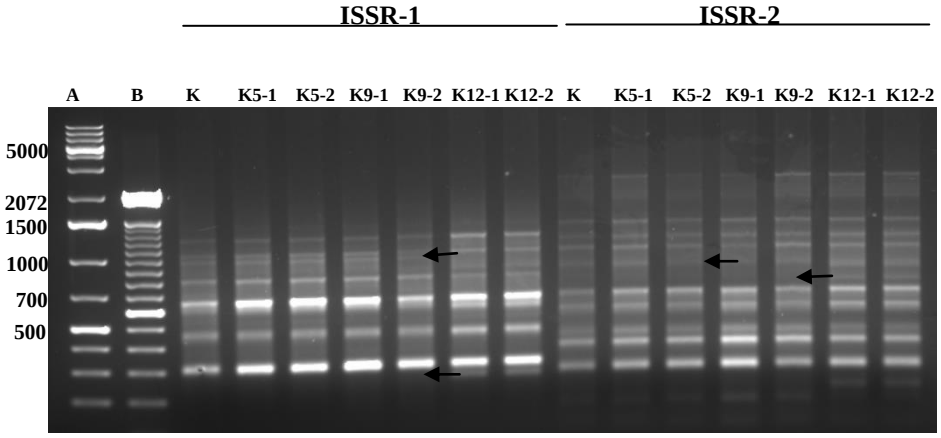


Şekil 4.81. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. vera* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

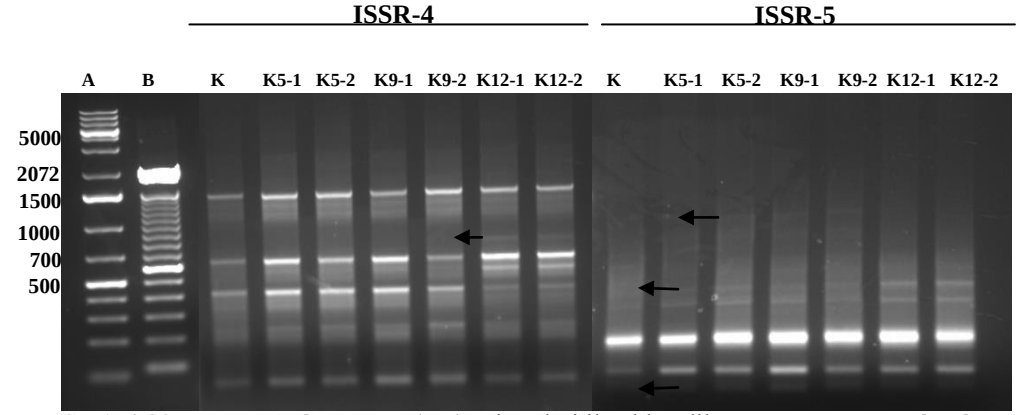
P. vera × *P. vera* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.81.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K9-1 ile K5-2, K5-1 ile Kontrol ve K12-2 ile K12-1 bireylerinin olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise K12-2 ile K9-1 bireyidir.

4.12.2.6. *P. vera* × *P. terebinthus* Klonunda Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

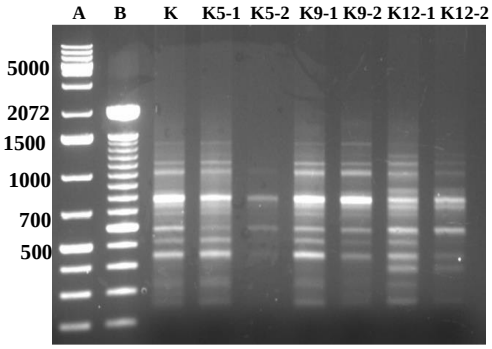
Toplamda 5 farklı ISSR primeri (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6), 7 farklı IRAP primeri (IRAP-2, IRAP-4, IRAP-5, IRAP-7, IRAP-9, IRAP-10 ve AYF2) primeri ile *P. vera* × *P. terebinthus* genotipi için yapılan ISSR - IRAP PCR reaksiyonu sonucunda, her bir primer için amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.82., 4.83., 4.84., 4.85., 4.86., 4.87. 4.88. ve 4.89.**'da görüntülenmektedir. Her bir primer ile elde edilen ISSR - IRAP PCR profillerine göre, ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, klon bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılmıştır.



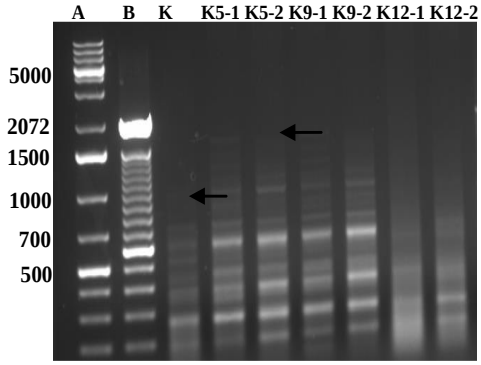
Şekil 4.82. ISSR-1 (sol) ISSR-2 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



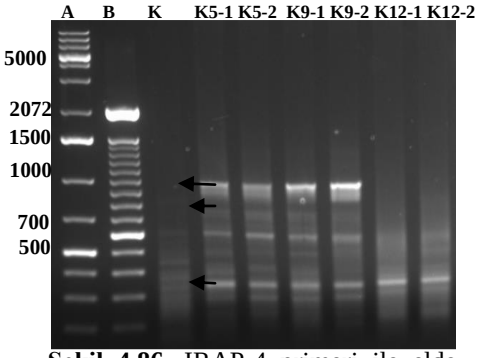
Şekil 4.83. ISSR-4 (sol) ISSR-5 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik garoz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



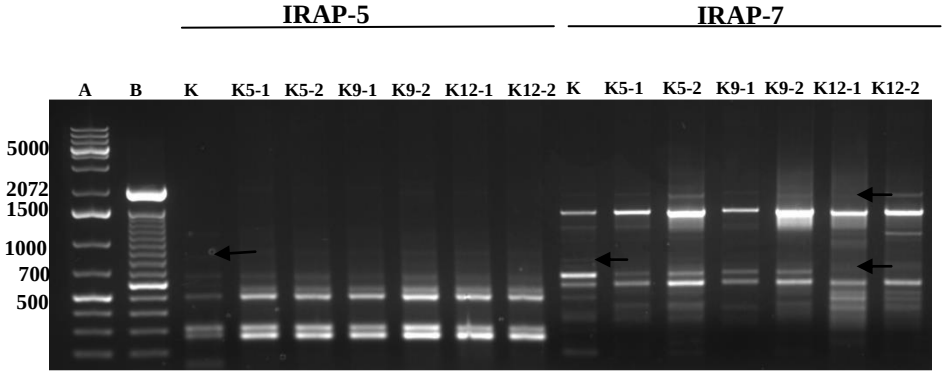
Şekil 4.84. ISSR-6 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* ISSR profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



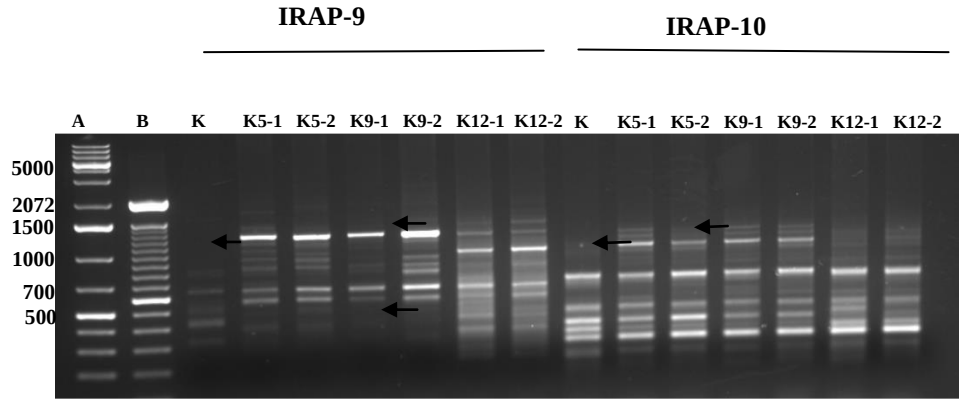
Şekil 4.85. IRAP-2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



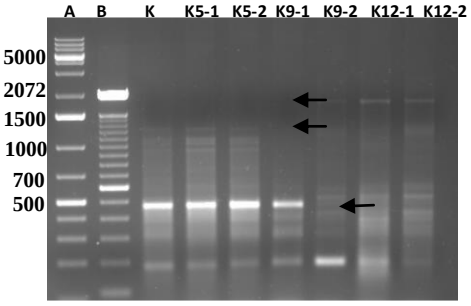
Şekil 4.86. IRAP-4 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.87. IRAP-5 (sol) IRAP-7 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.88. IRAP-9 (sol) IRAP-10 (sağ) primerleri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* IRAP profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği



Şekil 4.89. AYF2 primeri ile elde edilen *P. vera* × *P. terebinthus* profilleri (%1.5'lik agaroz jel): **A**: 1 kb Ladder DNA, **B**: 100 bp Ladder DNA, **K**: Kontrol, **K5-1**: 5.ayın 1. örneği, **K5-2**: 5.ayın 2. örneği, **K9-1**: 9. ayın 1. örneği, **K9-2**: 9. ayın 2. örneği, **K12-1**: 12. ayın 1. örneği, **K12-2**: 12. ayın 2. örneği

P. vera × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı ve yüzdesi, PIC değerleri Çizelge 4.46.'de gösterilmiştir. Tüm PCR amplifikasyonları sonucunda, 150 bç'den 2.5 kb büyüklüğüne kadar toplam 144 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri için 6-15 arasındaolmak üzere toplam 58 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 29'u (%50) polimorfik olarak

belirlenmiştir. IRAP primerleri için 10-16 arasında olmak üzere toplam 86 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 63'ü (%73.25) polimorfik olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı, IRAP-9 primeri ile %93.33 amplifikasyon sırasında görülürken, en düşük polimorfizm ISSR-2 primeri ile %26.66 olarak olarak ölçüldü. PIC değerleri karşılaştırıldığında ise ISSR primerleri için en yüksek PIC değeri yani en çok polimorfik bant elde edilen primer 0.3 ile ISSR-6 primeri oldu. En düşük PIC değerini 0.11 ile ISSR-2 primerinden elde edildi. ISSR primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.192 olarak hesaplandı. IRAP primerleri için PIC değerleri karşılaştırıldığında en yüksek PIC değeri 0.36 ile IRAP-9 primeri olurken, en düşük PIC değerini 0.16 ile IRAP-5 primeri verdi. IRAP primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.288 olarak hesaplandı (Çizelge 4.46.).

Çizelge 4.46. *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR ve IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilen bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değerleri

Primer adı	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi (%)	PIC değeri *
ISSR-1	280-1300	12	5	41.66	0.17
ISSR-2	150-2500	15	4	26.66	0.11
ISSR-4	300-2200	11	7	63.63	0.26
ISSR-5	250-1500	6	2	33.33	0.12
ISSR-6	250-1400	14	11	78.57	0.3
Toplam		**58**	**29**		
Ortalama				**48.77**	**0.192**
IRAP-2	200-1450	12	8	66.66	0.26
IRAP-4	200-1000	10	8	80.0	0.32
IRAP-5	150-2072	10	5	50.0	0.16
IRAP-7	230-2072	16	11	80.0	0.27
IRAP-9	300-1900	15	14	93.33	0.36
IRAP-10	200-1400	12	9	75.0	0.33
AYF2	200-1500	11	8	72.72	0.32
Toplam		**86**	**63**		
Ortalama				**73.95**	**0.288**

*PIC: Polimorfizm bilgi içeriği

5 farklı ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.47.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. terebinthus* klonunda ISSR-6 primeri ile 11 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant veren primer ise 2 bant ile ISSR-5 primerleri olmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 5.8'tür. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-2 primeri ile 11 banttır. En az monomorfik bant elde edilen primer ise ISSR-6

primerinde 3 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 5.8 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.79 ile ISSR-6 primeri ile elde edilirken, ISSR-2 primerinde polimorfik lokus oranı 0.27 ile en düşük oran olarak kaydedilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.49 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.47. *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının ISSR primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	ISSR-1	ISSR-2	ISSR-4	ISSR-5	ISSR-6	Ortalama
nP*	5	4	7	2	11	5.8
nM**	7	11	4	4	3	5.8
nL***	12	15	11	6	14	11.6
pP****	0.42	0.27	0.64	0.33	0.79	0.49

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

Çizelge 4.48. *P. vera* × *P. terebinthus* melezinde IRAP primerlerinin ayrımlama kapasitesi

	IRAP-2	IRAP-4	IRAP-5	IRAP-7	IRAP-9	IRAP-10	AYF2	Ortalama
nP*	8	8	5	13	14	9	7	9.143
nM**	5	2	5	6	1	3	3	3.571
nL***	13	10	10	19	15	12	10	12.71
pP****	0.62	0.8	0.5	0.68	0.93	0.75	0.7	0.7114

*: Polimorfik lokus, **: Monomorfik lokus, ***: Toplam lokus, ****: Polimorfik lokus oranı

7 farklı IRAP primerinin ayrımlama kapasitelerine göre elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.47.) değerlendirildiğinde *P. vera* × *P. terebinthus* klonunda IRAP-9 ve IRAP-7 primerleri ile 14 ve 13 bant olmak üzere en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. En az polimorfik bant ise IRAP-5 primeri ile 5 bant olarak bulunmuştur. Bütün primerlerin ortamlama polimorfik bant sayısı ise 9.143'dür. En fazla monomorfik bant elde edilen primer ise 6 bant ile IRAP-7 primeri olmuştur. En az monomorfik bant elde edilen primer ise IRAP-9 primeri ile 1 bant olarak bulunmuştur. Ortalama monomorfik bant oranı 3.571 olarak kaydedilmiştir. Polimorfik lokus oranı en yüksek 0.93 ile IRAP-9 primeri ile elde edilirken, en az polimorfik lokus oranı 0.5 ile IRAP-5 primeri olmuştur. Ortalama polimorfik lokus oranı ise 0.7114 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.49. ISSR primerleri kullanılarak *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değerleri

	Kontrol	K5-1	K5-2	K9-1	K9-2	K12-1	K12-2
Kontrol	1						
K5-1	0.78	1					
K5-2	0.66	0.78	1				
K9-1	0.76	0.90	0.79	1			
K9-2	0.77	0.88	0.80	0.94	1		
K12-1	0.74	0.77	0.58	0.69	0.70	1	
K12-2	0.67	0.71	0.63	0.63	0.61	0.90	1

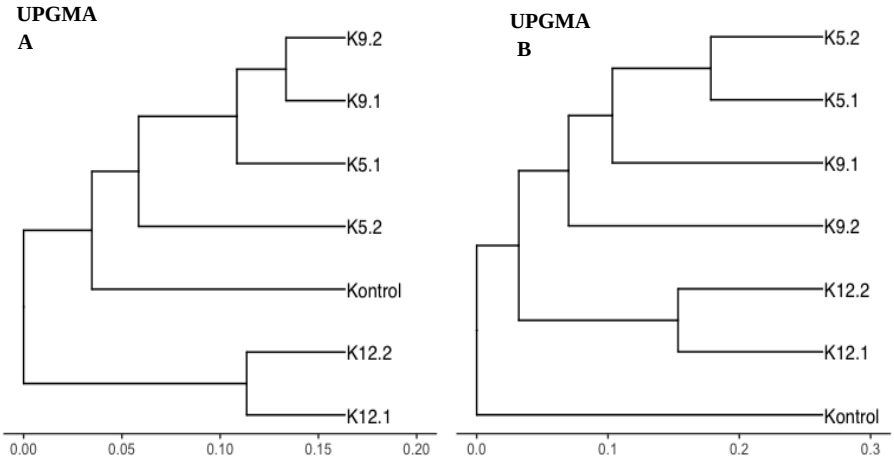
P. vera × *P. terebinthus* genotipine ait klonlardan ISSR belirteçleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.49.) ve dendogram (Şekil 4.90.A.) incelendiğinde, benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin *P. vera* × *P. vera* genotipinde ISSR belirteçleri ile benzer sonuçlar elde edilmiş olup 0.58 ile 0.94 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.74 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 9. ay klonu (K9-2) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise 12. ay klonu (K12-1) bireyidir. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K9-1 bireyi ile K9-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K12-1 ile K5-5 bireyi arasında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.50. IRAP belirteçleri kullanılarak *P. vera* × *P. terebinthus* klonlarının benzerlik değerleri

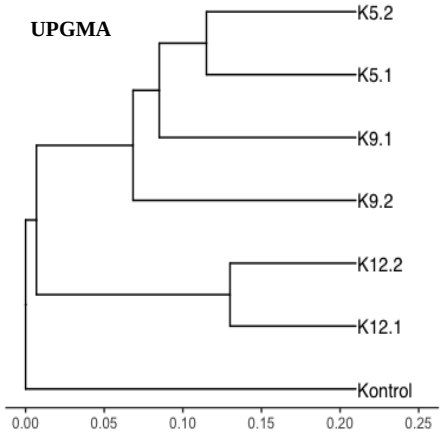
	Kontrol	K5-1	K5-2	K9-1	K9-2	K12-1	K12-2
Kontrol	1						
K5-1	0.45	1					
K5-2	0.48	0.83	1				
K9-1	0.48	0.69	0.67	1			
K9-2	0.45	0.63	0.60	0.60	1		
K12-1	0.52	0.55	0.54	0.53	0.56	1	
K12-2	0.46	0.55	0.51	0.49	0.57	0.78	1

P. vera × *P. terebinthus* genotipine ait klonlardan IRAP primerleri kullanılarak elde edilen jel profillerinin yorumlanması sonucu ortaya çıkan verilerle hazırlanmış olan benzerlik matriksi (Çizelge 4.50.) ve dendogram (Şekil 4.90.B.) incelendiğinde,

benzerlik matriksinde kontrol grubu ve klonları arasında benzerliklerin 0.45 ile 0.83 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.56 olarak belirlendi. Kontrol grubuna en yakın klon 5. ay klonu (K5-2) olmuştur. Kontrol grubuna en uzak klon ise 5. ve 9. ay klonu (K5-1 ve K9-2) bireyidir. IRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen benzerlik sonuçlarına göre klonların kendi aralarında olan benzerlik oranları değerlendirildiğinde; birbirine en yakın klonların K5-1 bireyi ile K5-2 bireyi olduğu, birbirine en az benzeyen yani en uzak klonların ise K5-1 ile Kontrol ile K9-2 bireyi ile Kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.90. A. ISSR primerleri ile *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram
B. IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram



Şekil 4.91. ISSR ve IRAP primerleri ile *P. vera* × *P. terebinthus* melezinin UPGMA analizi kullanılarak oluşturulan dendrogram

P. vera × *P. terebinthus* genotipine ait klonları ile ISSR ve IRAP primerlerinin birlikte kullanarak elde edilen dendogram (Şekil 4.91.) incelendiğinde, birbirine en yakın iki klonun K5-1 ile K5-2 ve K12-1 ile K12-2 bireylerinin olduğu görülmektedir. Birbirine en uzak iki klon ise Kontrol ile K5-2 bireyidir.

4.12.3. Somaklonal Varyasyon Analizlerinin Genel Değerlendirilmesi

Son zamanlarda doku kültürü ile çoğaltılmış bitki rejenerantlarının genetik kararlılığının belirlenebilmesi için yapılan çalışmalarında DNA temelli moleküler belirteç sistemleri çok fazla kullanılmaya başlanmıştır.

Pistacia cinsinin moleküler karekterizasyonu için IRAP ve ISSR primerleri ile yapılan sayılı çalışmalar bulunmaktadır.

Kafkas ve Perl-Traves (**2002**), RAPD, ISSR ve AFLP belirteç sistemlerini kullanarak Türkiye'de bulunan 69 antepfıstığı çeşidini tanımlamışlardır. Bu çeşitler arasındaki ilişkileri genetik olarak belirlemişlerdir. Yapmış oldukları çalışma sonucunda 572 moleküler belirteç tanımlamışlardır. 572 primer içinde 307 tanesi yani %53.6'sı polimorfizm göstermiştir.

Martins ve ark. (**2004**), tarafından yapılan bir çalışmada *in vitro* çoğaltılmış bademlerde 4 ve 6 yıl boyunca klonlanarak elde edilmiş 22 klon bitkinin genetik kararlılıklarını belirlemek için, toplamda 64 RAPD ve 10 ISSR primeri kullanılarak değerlendirilmiş ve herhangi bir somaklonal varyasyona rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Modgil ve ark. (**2005**), tarafından yapılan çalışmada RAPD ve ISSR kullanarak klonal olarak çoğaltılmış elma (*M. pumila*) adventif sürgünleri genetik kararlılık gösterirken, RAPD analizi ile yaprak kökenli elma klonlarında (**Virscek- Marn ve ark. 1999**), şeftali somatik embriyolarında (**Hashmi ve ark. 1997**) ve limon (*Citrus limon*) protoplast regenerantlarında (**Deng ve ark. 1995**) genetik kararlıklarının doğrulanması için kullanıldı.

Venkatachalam ve ark. (**2007**), tarafından rapor edilen bir çalışmada ise *in vitro* çoğaltılan muz bitkilerinde, 12 ISSR ve 50 RAPD primeri kullanılarak yapılan moleküler analizler sonucu elde edilen verilerde, herhangi bir genetik kararsızlık rapor edilmemiştir.

Ehsanpour ve ark. (2008), *P. vera* L.çeşitlerinin (Akbari, Ahmad Aghaii, Fandoghi, Kaleh Ghochi) cinsiyet belirleme çalışması için 9 ISSR pirimeri kullanılmıştır.

Noroozi ve ark. (2009), İranda 31 *Pistacia* genotipinde (30 dişi, 1 erkek) 3 farklı ISSR primeri kullanarak polimorfizm yüzdesi %46.42 olarak bulunarak genetik çeşitliliğin ilk çalışması olmuştur.

Farès ve ark. (2009), tarafından morfolojik (tohum büyüklüğü, meyve büyüklüğü, yaprak genişliği, son yaprakçığın formu ve onların uzunluğu) ve kimyasal (vitamin içeriği) belirteçlerle destekleyerek ISSR belirteçleri kullanarak 15 fıstık ağacının genetik çeşitliliği ile ilgili yaptıkları çalışmada, 3 varyetede polimorfik lokus yüzdesi %38.46 gibi yüksek bir oran elde ederken, 12 varyetede polimorfizm ortalaması %34.61 - %26.92 arasında bir değer elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Baghizadeh ve ark. (2010), ISSR, SSR ve RAPD belirteçleri ile İran'da 31 *P. vera* L. çeşit ve genotipinde genetik çeşitliliğinin belirlemesinde kullanmışlardır. Genetik benzerlik matriksine dayanarak genel prensip koordinat analizi (PCA) toplam moleküler varyasyonun %28.6'sından sorumlu olan ilk 3 özdeğerdi. Polimorfizm yüzdeleri; SSR belirteç sistemi ile %100, ISRR ile %46.42 ve RAPD ile %58.33 olarak kaydedilmiştir.

Biswas ve ark. (2010), turunçgil üzerinde genetik çeşitliliği ve akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla kullandıkları 4 farklı RAPD, ISSR, IRAP ve REMAP belirteç sistemiyle yaptıkları çalışmada yüksek seviyelerde polimorfizm elde etmişlerdir.

Campbell ve ark. (2010), doku kültürü sonucunda meydana gelebilecek somaklonal varyasyonları belirlemek amacıyla IRAP ve ISSR primerleri ile arpanın (*Hordeum vulgare)* 147 rejenerantı ve ana materyal arasında yaptıkları çalışmada; ISSR belirteç sistemi ortalama 218 bantta 29 polimorfizm oranı, IRAP belirteç sistemi ile 121 bantta 15 polimorfizm oranı elde etmişlerdir.

D'Onofrio ve ark. (2010), 29 asma genotipinde REMAP, ISSR, IRAP, SSAP, AFLP ve SSR belirteç sistemleri ile yaptıkları detaylı analizlerde PIC değerleri sırasıyla; 0.4789 a, 0.4393 ab, 0.4511 ab, 0.4564 ab, 0.4036 b ve 0.3873 c ile en yüksek PIC değerini REMAP belirteç sistemi ile elde etmişlerdir.

Kebour ve ark. (**2012**), Cezayirde 10 *P.vera* L. varyetesinde genetik ilişkileri belirlemek için 6 ISSR primeri kullanılmış ve 111 bantın 60 (%54.04) polimorfik olarak belirlenmiş ve polimorfizm yüzdesi 0 - 100 arasında değiştiğini kaydetmişlerdir.

Ghaemmaghami ve ark. (**2013**) tarafından İran'da bulunan *Pistacia* cinsinin (*P. vera, P. khinjuk* ve *P. atlantica*) çeşitliliği ve durumu ile ilgili IRAP belirteç sistemleri ile yaptıkları bir çalışmada; %89.6 polimorfizm oranı elde etmişlerdir.

Dogan ve ark. (**2014**), Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladıkları 59 ceviz genotipleri ile 25 ISSR primeri kullanarak genetik karekterizasyon çalışması yapmışlar ve primer başına ortalama bant sayısını 8.44 olarak bulurken, ortalama polimorfizm oranını %69.05 olarak elde etmişlerdir.

Kılınç ve ark. (**2014**), sakız ağacının (*P. lentiscus* L.) 6, 9 ve 12 kere alt kültürlenmesi ile elde edilen mikroçoğaltılmış bitkiciklerden ve ana bitkiden DNA'lar izole edilmiştir ve in vitro türetilmiş bitkicikler arasında muhtemel mevcut değişiklikleri ve genetik kararlılıklarının belirlenmesi ve değerlendirilmesi için IRAP analizlerine tabi tutulmuştur. Jaccard similarite katsayısı ile benzerlik yüzdeleri hesaplanarak dört genotipte %78-86 arasında değişmekte olduğunu kaydetti. Varyasyonun ana bitki ve onun tüm klonlarının rejenerantları arasında gözlenmiş olmasına rağmen

Lee ve ark. (**2015**), 16 zambak türünde IRAP analizleri ile yaptıkları filogenetik analiz çalışmalarında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Kırdök ve Özden-Çiftçi (**2015**), İPBS, IRAP ve REMAP belirteç sistemleri ile 7 Akdeniz *Pistacia* türü arasındaki (*P. vera* L. cv. Siirt, *P. khinjuk* Stocks, *P. mutica* Fischer, *P. atlantica* Desf., *P. palaestina* Boiss., *P. terebinthus* L. ve *P. lentiscus* L.) genetik farklılıkların çözümlenmesi için yaptıkları çalışmada belirteç sistemleri arasındaki polimorfizm oranlarının sırasıyla, 0.94, 0.94 ve 0.93 olarak kaydetmişlerdir.

Turhan-Serttaş (**2016**), Türkiye'de 35 doğal lokaliteden toplanan sakız ağacı örneklerinin türiçi varyasyonu belirlemek için mikrosatellit ve retrotranspozon arası gen bölgeleri düzeyinde ISSR ve IRAP belirteç sistemleri ile kullanılarak araştırıldır, seçilmiş 12 ISSR primerinden 9'u 161 - 1884 bp arasında 81 bant elde edilmiş ve bu bantlardaki polimorfizm oranı %96.3 olarak belirlenmiştir. IRAP beirteçleri ile yapılan PCR analizlerinde IRAP PZR sonucunda ise Bagy-1 bölgesinde 126-1426 bç arasında 20 bant, LTR2 bölgesinde 192 - 1844 bç arasında 17 bant ve LTR4 bölgesinde

124 - 2027 bç arasında 35 bant fragmenti ile tam polimorfizm elde edilmiştir. PIC değerleri 0.458 (ISSR) ve 0.418 (IRAP) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre yabani genotipler ve bazı kültür varyeteleri arasında elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; *P. lentiscus*'un türiçi varyasyonun çok yüksek oranlara sahip olduğudur.

Akdemir ve ark. (**2016**), uzun dönem *in vitro* mikroçoğaltımı yapılmış olgun antepfistıklarının apikal tomurcuklardan (A) ve yapraklardan başlatılmış (B) kültürlerden elde edilen sürgünlerin RAPD, AFLP ve ISSR belirteç sistemlerini kullanarak moleküler kararlılıklarını belirlenmiştir.

Uzun ve ark. (**2017**), Orta Anadolu'da bulunan Kayeri yöresinden seçilmiş 50 ceviz genotipleri arasında genetik ilşkileri belirlemek amacıyla 20 SRAP moleküler belirteçleri ile yaptıkları çalışmada, 117 tanesi polimorfik olmak üzere toplamda 130 bant elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan ceviz genotipleri arasındaki genetik benzerlik oranları 0.62 - 0.93 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Genetik yakınlık olarak birbirine 0.93'lük benzerlik oranı ile en fazla benzeyen 49 ve 50 numaralı genotipler olmuştur. Islah çalışmaları acısından yüksek polimorfizm eldesi sonucunda bu çalışma büyük önem taşımaktadır.

Sorkheh ve ark. (**2017**), SCoT (Potential Start Codon Targeted) ve IRAP belirteçleri kullanılarak İranın farklı coğrafik bölgelerinden toplananan 50 yabani *Pistacia* populasyonunun korunması ve genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi için yaptıkları çalışmada 8 IRAP belirteci kullanarak toplamda 115 bant elde edilmiş ve bu bantların 104'ü (%90.4) polimorfik olarak bulunmuş ve 44 SCoT primeri ile 246'sı (%68.7) polimorfik olmak üzere 358 bant elde etmişleridir. Ortalama PIC değerini IRAP pirmeri ile 0.32 ve SCoT primeri ile 0.48 olarak elde etmişleridir.

Choulak ve ark. (**2017**), yaptıkları bu çalışma ileTunus fıstıklarında kloroplast DNA dizi varyasyonlarının seviyesini bulmayı ve *trn*L-*trn*F intergenik ara parçasını kullanarak bir grup fıstık çeşidinin arasında ilişki kurabilmeyi amaçlamışlardır.

Alhajjar ve Muzher (**2017**), Suriye Tarım Bakanlığı tarafından onaylı 5 ana ticari erkek Pistacia vera L. çeşidi (Adam, Jamil, Ebrahim, Elyas ve Khalifa) ile 15 farklı erkek genotip arasında genetik ilişkileri belirlemek amacıyla SSR belirteçleri ile çalışmışlardır. 20 SSR primeri üzerinden 17 SSR primer çifti ile PCR ürünleri çoğaltılar. SSR ayrıştırması ile 44 kabul edilir allel ürettiler. 44 allelden 34'ü (%77.27)

polimorfikti. Bütün çalışılan genotipler arasında benzerlik oranı Jamil ve MAS1 çeşitleri arasında 0.45 ila 1 arasında değiştiğini, Ebrahim çeşidi ile MA1 genotipinin aynı olduğunu kaydetmişlerdir. Jaccard'ın UPGMA kümeleme analizi ile bütün genotipleri 3 grupta topladılar. Polimorfik allel sayısını Marker Indeksi ile (MI) 23.97 olarak belirlediler.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kontrollü tozlaşma ile elde edilen melez antepfıstığı bitkilerinin tek bir tohumdan *in vitro*'da çoğaltılan 6 klonu arasında meydana gelebilecek somaklonal varyasyonların belirlenebilmesi amacıyla 2 moleküler belirteç sistemi kullanılmıştır. ISSR belirteç sistemi ile genomdaki basit dizi tekrarları (SSR) arasında bulunan bölgedeki değişiklikleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır. IRAP belirteç sistemi ile retrotranspozon arasında bulunan bölgedeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. IRAP belirteç sistemleri bu özelliklerinden dolayı çok sayıda genetik çeşitlilik çalışmasında kullanılmıştır (**Antonius-Klemola ve ark. 2006; Kalender ve Schulman 2006; Smykal ve ark. 2008; Vukich ve ark. 2009)**.

6 farklı melez *Pistacia* genotipinde kontrol grubu ve klonlar arasında tüm analizler sonucunda farklı polimorfizm yüzdeleri elde edildi. En yüksek polimorfizm oranını gösteren, *P. vera* × *P. terebinthus* genotipinin IRAP-9 primerinde %93.3 olurken, herhangi bir polimorfizm göstermeyen ise *P. khinjuk* × *P. terebinthus* genotipinde ISSR-4 ve ISSR-5 primerleri olmuştur. Eğer klonları kendi içlerinde değilde kendi aralarında kıyaslarsak her 3 primerin ortalama değeri alındığında en yüksek ortalama polimorfizm yüzdesini veren genotip *P. khinjuk* × *P. atlantica* (%97.21) olurken, en düşük ortlama polimorfizm yüzdesi *P. vera* × *P. vera* (%68.12) genotipinden elde edilmiştir. Ortalama PIC değerleri kıyaslandığında ISSR primeri için en yüksek değeri *P. vera* × *P. atlantica* (0.224) genotipi verirken en düşük değeri *P. khinjuk* × *P. terebinthus* (0.056) genotipi vermiştir. IRAP primerlerinin PIC değeri karşılaştırıldığında en yüksek değeri *P. vera* × *P. terebinthus* (0.288) genotipi, *P. khinjuk* × *P. khinjuk* (0.185) genotipi ise en düşük polimorfik bilgi içeriğine sahiptir.

ISSR ve IRAP primerleri ile elde edilen sonuçlardaki farklılıklar, genetik kararlılığın belirlenmesinde birden fazla belirteç kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Genomun tek bir bölgesinin değil de farklı belirteçler kullanılarak, farklı bölgelerinin taranması genetik kararlılığın belirlenmesinde daha anlamlıdır.

Elde edilen PIC değerlerine göre, literatürdeki çalışmalara göre doku kültüründe somaklonal varyasyonların kültürün ilk zamanlarında genelde oluşmadığı belirtilmesine rağmen, tez kapsamında yapılan çalışmalarda kültürün ilk 5 ayında dahi düşük de olsa genetik kararsızlık belirlenmiştir. Bununla birlikte, tez materyali olarak kullanılan 6 melez türün de mikroçoğaltımında 12 ayda ortalama düzeyde makul bir somaklonal varyasyon gözlenmiştir ($0.25 \leq PIC \leq 0.5$). Elde edilen değerler optimize edilen mikroçoğaltım yöntemlerinin bu hibritlerin çoğaltılmasında güvenle kullanılabileceğini (**Botstein ve ark. 1980; Akdemir ve ark. 2016**) göstermektedir.

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.

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

Abreu, IS., Carvalho, CR., Clarindo, WR., 2014. Massal induction of *Carica papaya* L. 'Golden' somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. ***Cytologia,*** 79(4): 475–484.

Afrasiab, H. and Iqbal, J., 2010. *In vitro* techniques and mutagenesis for the genetic improvement of potato cvs. Desiree and Diamant. ***Pak J Bot.,*** 42: 1629–1637.

Afzadi, M.A., Tabatabaei, B.E.S., Mohammadi, S.A. and Tajabadipur, A., 2007. Comparison of Genetic Diversity in Species and Cultivars of Pistachio (*Pistacia* sp. L.) Based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers. ***Iranian Journal of Biotechnology,*** 5(3): 147-152.

Ahloowalia, B.S. 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass, ***Crop Sci***., 23: 1141-1147.

Ahloowalia, B.S. and. Sherington, J., 1985. Transmission of somaclonal variation in Wheat. ***Euphytica,*** 34: 525-537.

Ahmad, R., Ferguson, L. and Southwick, S.M., 2003. Identification of *Pistachio* (*Pistacia vera* L.) Nuts with Microsatellite Markers. ***J. Amer. Soc. Hort. Sci.,*** 128 (6): 898-903.

Ahmad, R., Ferguson, L. and Southwick, S.M., 2005. Analyses of *Pistachio* Rootstocks by SSR and SRAP Molecular Markers. ***Journal of Horticultural Science and Biotechnology,*** 80 (3): 382-386.

Ahmadi Afzadi, M., Seyed Tabatabaei, B. E., Mohammadi, S. A. and Tajabadipur. A. 2007. Comparison of genetic diversity in species and cultivars of pistachio (Pistacia vera L.) based on amplified fragment length polymorphism marker. ***Iranian Journal of biotechnology,*** 5,147-152.

Ahuja, M.R. 2001. Recent advances in molecular genetics of forest trees. ***Euphytica,*** 121 (2), 173.

Ak, B.E., Ozguven, A.I.and Nıkpeyma Y. 1995. The Effect of GA_3 Applications on Pistachio Nut Seed Germination and Seedling Growth. ***Acta Horticulturae,*** 419: 115-120.

Aka-Kaçar Y., Patrick F., Byrne, Teixeira da Silva, J. A. 2013. Molecular Markers in Plant Tissue Culture, Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II, Global Science Books, UK, 444-449.

Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., and Çiftçi, Y. O. 2014. Micropropagation of the *pistachio* and its rootstocks by temporary immersion system. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),*** 117(1), 65-76.

Akdemir, H., Süzerer, V., Tilkat, E., Onay, A., Çiftçi, Y. O. 2016. Detection of Variation in Long-Term Micropropagated Mature Pistachio via DNA-Based Molecular Markers. ***Appl Biochem Biotechnol,.*** 180: 1301-1312.

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.

Albaladejo, R.G., Sebastiani, F., Aparicio, A., Buonamici, A., Gonzalez-Martinez, S.C., and Vendramins, G.G. 2008. Development and Characterization of Eight Polymorphic Microsatellite Loci from *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). ***Molecular Ecology Resources***, 8: 904-906.

Alderson, P.G., Barghchi, M. 1982. Potential for Pistacia propagation tgrough shoot, leaf and callus culture. In plant tissue culture 1982: proccedings 5th international congress of plant tissue and cell culture held at Tokyo and Yake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982/ed Akio Fujiwara. Tokyo: Japanese Association for Plant Tissue Culture.

Alhajjar, N.M., Muzher, B.M., Hamed, F. 2016. Assessing Genetic Relationships between *Pistacia vera* L. Hybrids and their Parents (*P. vera* × Monoecious Genotypes of *P. atlantica*) Using SSR Markers. ***Jordan Journal of Agricultural Sciences,*** Volume 12, No.1.

Alhajjar, N.M., and Muzher B.M. 2017. Identification of male genotypes in Pistacia vera L. species using SSR markers. ***International Journal of Environment,*** Volume-6, Issue-2, Page: 30-42.

Alizadeh, M., Singh S.K., Patel, V.B., 2010. Comparative performance of in vitro multiplication in four grape (Vitis spp.) rootstock genotypes. ***International Journal of Plant Production,*** 4(1): 41-50.

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

Al-Saghir, M.G., Porter, D.M. 2012. Taxonomic Revision of the Genus *Pistacia* L. (*Anacardiaceae*). ***American Journal of Plant Sciences,*** 3: 12-32.

Alvarez, M.E., Nota, F., Cambiagno, D.A. 2010. Epigenetic control of plant immunity. ***Mol Plant Pathol.,*** 11: 563–576.

Al-Yafi, J 1978. New characters differentiating *Pistacia atlantica* subspecies. ***Candollea,*** 33: 201–208.

Anonim, 2013. Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı Antepfıstığı Sektör Raporları. İhracat Genel Müdürlüğü. Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı, Ankara

Anonim, 2017a. https://www.crfg.org/pubs/ff/pistachio.html.

Anonim, 2017b. https://www.ekonomi.gov.tr/portal/content/conn/UCM/uuid/dDocName: EK-235483.

Anonim, 2018. http://www.freepatentsonline.com/y2015/0156935.html.

Antonius-Klemola, K., Kalendar, R. and Schulman, A.H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. ***Theor. Appl. Genet.,*** 112, 999–1008.

Armstrong, K.L., Nakamura, C., Keller, W.A. 1983. Karyotipe instability in tissue culture regenerant of triticale (X *Triticosecale* vvittmack) cv. "Welsh". ***Z.Pflanzenzüchtg,*** 91: 233-245.

Arnhold-Schmitt, B. 1993. Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.) ***Theor Appl Genet.,*** 85: 793–800.

Arpaci, S., Dagdeviren, I., Ak, B.E. and Tekin, H. 1999. Sulu Koşullarda Değişik *Pistacia* Türlerinin Gövde gelişimi ve Meyveye Yatma Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bit. Kong., Ankara, 258-262.

Arpaci, S., Açar, İ., Karadag, S., Atlı, H.S., Bilgel, L., Sürücü, A., Ak, B.E., 2013. "Sulu Koşullarda Antepfıstığı İçin Uygun Anaç ve Dikim Aralıklarının Belirlenmesi" Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Gaziantep, 2013.

Atli, H.S., Arpacı S., Akgün A., Kaşka N., Eskalen A., Can C., Özgüven A.I., Küsek M., Karadağ S., Sarpkaya K. 2002. "*Pistacia khinjuk* Stocks' un *Pistacia* Cinsinin Değişik Türleri Arasında Kontrollü Melezleme Yolu İle Sulu Koşullarda Antepfistıkları İçin Anaç Islahı", (TÜBİTAK Projesi), Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı.

Avanzato, D. and Quarta, R. 2004. Monoecious *Pistacia Terebinthus* found in Bulgaria. Crop Wild Relative. European Crop Wild Relative Diversity Assesment and Conservation Forum. Issue 2 July, 2004.

Ayaz-Tilkat, E., Namli, S., and Isikalan, C. 2011. Determination and Assesment of the Sex Chromosomes of Male Trees of *Pistachio* (*Pistacia vera* L.) Using *in vitro* Culture. ***Australian Journal of Crop Science,*** *5*(3), 291.

Ayfer, M. 1959. Antepfistığının Döllenme Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. ***Ankara Üniv. Zir. Fak.Yayınları***, No: 148, Ankara.

Ayfer, M. and Serr, E. F. 1961. Effects of gibberellin and other factors and seed germination and early growth in *Pistacia* species. ***J. Amer. Soc. Hort. Sci.,*** (77), 308-315.

Ayfer, M., 1964. Mutedil İklim Meyve Türleri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ders Notları, Ankara.

Ayfer, M. 1990. Antep Fıstıgının Dünü Bugünü Geleceği. Türkiye 1. Antep Fıstıgı Sempozyumu Bildirileri, 11-12 Eylül 1990- Gaziantep. pp. 14-23.

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

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2002. Bitki biyoteknolojisi-1, Doku Kültürü ve Uygulamaları. ***Selçuk Üniversitesi Vakfı yayınları***, Konya.

Baghizadeh, A., Noroozi, S. and Javaran, J.M. 2010. Study on genetic diversity of some Iranian Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD), inter sequence repeat (ISSR) and simple sequence repeat (SSR) markers: A comparative study. ***African Journal of Biotechnolog,.*** Vol. 9(45), pp. 7632-7640.

Bairu, M.W., Fennell, C.W., van Staden, J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish* banana (*Musa*, AAA cv. 'Zelig') ***Sci Hortic.,*** 108: 347–351.

Bairu, M.W., Aremu, A.O., and Van Standen, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. ***Plant Growth Regulation,*** 63, 147–173.

Bajaj, Y.P.S. 1990. Somaclonal Variation - Origin, Induction, Cryopreservation, and Implications in Plant Breeding. ***Biotechnology in Agriculture and Forestry,*** Vol. II, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bajaj, Y.P.S., 1991. Automated micropropagation for en masse production of plants. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. High-Tech and micropropagation 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3-16.

Barakat, M.N, El-Sammak, H. 2011. *In vitro* mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in baby's breath '*Gypsophila paniculata* L, ***Aust J Crop Sci.,*** 5(2): 214–222.

Barazani, O., Dudai, N. and Golan-Goldhirsh, A. 2003. Comparison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses, ***Journal of Chemical Ecology,*** 29, 1939-1952.

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

Barghchi, M. and Alderson, P. G. 1983. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. ***Journal of Horticultural Science,*** *58*(3), 435-445.

Barghchi, M. and Martinelli, 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 application,*** Univ. of Nottingham, Abst., p. 75.

Barghchi, M. and Alderson, P.G. 1985. *In vitro* propagation of *P. vera* L. and commercial varieties of Ohadi and Kelleghochi, ***J. Hortic. Sci.,*** 60: 423-440.

Barghchi, M. 1985a. In vitro culture of mature commercial *Pistacia vera* L. cultivars. ***Proc.Inter. Plant Prop's, Soc.,*** 35: 331–333.

Barghchi, M. 1985b. In vitro micropropagation *Pistacia* rootstocks cultivars. ***Proc. Inter. Plant Prop's, Soc.,*** 35: 334–337.

Barghchi, M. 1986a. "Control of *in vitro* shoot tip necrosis in *Pistachio* (*Pistacia vera* L.)", Plant Physiology Division Biennial Report, ***Palmerston North Department of Scientific and Industrial Research (D.S.I.R),*** p: 52.

Barghchi, M. 1986b. *In vitro* micropropagation of *Pistacia* rootstocks. ***Proceeding of the International Plant Propagators Society,*** 35: 334-337.

Barghchi, M. and Alderson, P.G. 1989. *Pistachio* (*Pistacia vera* L.), Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 5. Trees II, Editor: Bajaj Y.P.S., ***Springer-Verlag,*** Berlin, Heidelberg. pp: 68-98.

Barone, E., Di Marco, L., Marra, F.P., Sidari, M. 1996. Isozymes and canonical discriminant analysis to identify pistachio (*P. vera* L.) germplasm. ***Hort. Science,*** 31: 134–138.

Bartoszewski, G., Havey, M.J., Ziókowska, A., D'ugosz, M., Malepszy, S. 2007. The selection of mosaic (MSC) phenotype after passage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through cell culture—a method to obtain plant mitochondrial mutants. ***J Appl Genet.,*** 48: 1–9.

Basha, A. I., Padulosi, S., Chabane, K., Hadj-Hassan, A., Dullo, E., Pagnotta, M. A. and Porceddu, E., 2007. Genetic Diversity of Syrian Pistachio (*Pistacia vera* L.) Varieties Evaluated by AFLP Markers. ***Genet. Resour. Crop Evol.,*** 54: 1807- 1816.

Bell, R.L., Srinivasan, C., Lomberk, D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. ***In Vitro Cell Dev Biol. Plant,*** 45, 708–714.

Bello-Bello, J.J., Iglesias-Andreu, L.G., Avilés-Viñas, S.A., Gómez-Uc, E., Canto-Flick, A., Santana-Buzzy. N. 2014. Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. ***HortScience.,*** 49(4):481–485.

Benmahioul, B. 2009. Amélioration de la micropropagation in vitro du pistachier (Pistacia vera L.) en vue de l'extension des vergers en Algérie. [Ph.D. Thesis.] Oran, University of Sciences and Technology of Oran, 129p.

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

Benmahioul, B. 2017. Factors affecting in vitro micropropagation of Pistachio (Pistacia vera L.). ***Agriculture and Forestry Journal,*** Vol. 1, Issue 1, pp. 56-61, June, 2017.

Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., Krauss, S.L. 2005. Genetic analysis of cotyledon derived regenerants of tomato using AFLP markers. ***Curr Sci.,*** 88(2): 280–284.

Bhatia, R., Singh, K.P., Jhang, T., Sharma, T.R. 2009. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. ***Sci Hortic.,*** 119: 208–211.

Bhatia, R., Singh, K.P., Sharma, T.R., Jhang, T. 2011. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 104(1): 131–135.

Bilgen, A.M. 1968. Memleketimizde Bulunan Antepfistigi Anaçlari ve Aşılama Tekniği. ***Tarim Bak. Zirai. Isl. Gen. Mud. Yayinlari,*** Ankara.

Bilgen, A.M. 1973. *Pistachio*. ***Ministry of Agriculture J.,*** Ankara. s.123.

Bilgen, A. M. 1985. Değişik Antep Fıstığı Anaçlarıyla Bunlar Üzerine Aşılı Antep Fıstığı Çeşitleri Arasında Topraktan Bitki Besin Maddeleri Alımları Bakımından Karşılıklı Etkileşmeler, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Biswas, M.K., Qiang, X. & Deng, X. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp.. ***Scientia Horticulturae,*** 124. 254-261.

Blair, M.W., Panaud, O., McCouch, S.R. 1999. ISSR amplification for analysis of microsatellite moti frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). ***Theor Appl Genetics,*** 98: 780–792.

Bornet, B.,and Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. ***Plant molecular biology reporter,*** *19*(3), 209-215.

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

Bouharmont, J., 1994. Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. ***Acta Hortic.,*** 355: 213–218.

Branco, M. R., Pombo, A. 2007. Chromosome organization: new facts, new models. ***Trends in cell biology,*** *17*(3), 127-134.

Brar, D.S., Jain, S.M.1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S., editors. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.Dordrecht: ***Kluwer Academic Publishers,*** pp. 15–37.

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. ***Proc Natl Acad Sci***, USA, 45: 932–938.

Breiman, A., T. Felsunburg and E. Galun, 1987a. Nor loct analysis in. progerûes of plants regenerated from the scutellar callus of breadwheat, A molecular approach toevaluate somaclonal variation. ***Theor. Appl. Genet.,*** 73: 827-831.

Breiman, A., D. Rotem-Abarbanell, A. Karp and H. Shaskin, 1987b. Heritable Somaclonal variation in vvild barley *(Hordeum spontaneum*). ***Theor. Appl. Genet.,*** 74: 104-112.

Buiatti, M., Scala, A., Bettini, P., Veturo, R. 1985. Correlanons between in vivo resistance to Fusarium and in vitro response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. ***Theoretical and Applied Genetic,*** April 1985. 70: 42-47.

Brossard, D., 1976. Influence of kinetin on formation and ploidy level of buds arising from *Nicoliana tabacum* pith tissue grown in vitro. ***Z. Pflanzenphysiol.,*** 78: 323-333.

Bustamante-Garcia, M.A. 1984. Micropropagation and Rejuvenation of *Pistacia* species and the mechanism by which light influences root initiation. PhD Thesis, University of California, Davis, USA.

Campbell, B. C., LeMare, S., Piperidis, G., Godwin, I. D. 2010. "IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley." ***Molecular Breeding,*** *27* (2), 193–206.

Can, C., Ozaslan, M., Toremen, H., Sarpkaya, K., Iskender, 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.

Caruso, T., Iannini, C., Barone, E., Marra, F.P., Sottile, F., Greco, C.I., Sabina, M.R., Martelli, G., Monastra, F., Battle, I., Vargas, F., Romero, M., Ak, B.E., Zakynthinos, G., Padulosi, S., Laghezali, M. 1998. Genetic and phenotypic diversity in *pistachio* (*P. vera* L.) germplasm collected in Mediterranean countries. ***Acta Hortic.,*** 470: 168–178**.**

Cassells, A.C., Curry, R.F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagator and genetic engineers ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture,*** 64: 145–157.

Chang, K. 1990. Market prospects for edible nuts. Nut Production Industry in Europe, Near East and North Africa. Reur Techical Series, 13: 47-86.

Chen, T.H.H., M.D. Lazar, G.J. Scoles, L.V. Gusta and K.K. Kartba, 1987. Somaclonal variation in a population of *wintre* wheat. ***J. Plant Physiol.,*** 130: 27-36.

Chen, W.H., Chen, TM., Fu, YM., Hsieh, R.M. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. ***Plant Cell Reports,*** 18, 7-13.

Choulak, S., Chatti, K., Marzouk, Z., and Chatti, N. 2017. Genetic differentiation and gene flow of some Tunisian pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties using chloroplastic DNA. ***Journal of Research in Biological Sciences.***, 02 (2017) 35-41

Clarindo, W.R., Carvalho, C.R,. Mendonça, M.A.C. 2012. Ploidy instability in long-term in vitro cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry. ***Plant Growth Regul.,*** 68(3): 533–538.

Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. ***Euphytica,*** *142*(1-2), 169-196.

Cooper, D., R. Sears, G. Lockhert and B. Jones, 1986. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from embryo callus culture. ***Theor Appl. Genet.,*** 71:784-790.

Couceiro, J.F., Guerrero, J., Gijón, M.C., Pérez-López, D., Moriana, A., Rodriguez, M., 2013. El Cultivo del Pistacho. Ediciones Paraninfo, Madrid.

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

Crane, J. C., and Iwakiri, B. T. 1981. Morphology and reproduction of pistachio. ***Horticultural Reviews,*** Volume *3*, 376-393.

Currais, L., Loureiro, J., Santos, C., Canhoto, J.M. 2013. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 114: 149–159.

Czene, M, Harms-Ringdahl, M. 1995. Detection of single-strand breaks and formamidoprymidine-DNA glycosylase-sensitive sites in DNA of cultured human fibroblasts. ***Mutat Res.,*** 336: 235–242.

Çalar, N. 2013. "Sakız ağacı (Pistacia Lentiscus L.)'nın Pistacia anaçları (*Pistacia vera* L., *Pistacia khinjuk* Stock, *Pistacia terebinthus* L., ve *Pistacia atlantica* Desf.) üzerine in vitro mikroaşılanması". Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Çalar, N., Yıldırım, H., Erdoğan, G., Pektanç, G., Onay, A., İlikçioğlu E. 2014. Melez *Pistacia* Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonunun Optimizasyonu ve *In Vitro* Çimlenme Kapasitelerinin Belirlenmesi. Turkey 5th Seed Congress With International Participation and Sectoral Business Forum Proseeding Book. Diyarbakır.

Çetiner, S., Yücel, H., Aka-Kaçar, Y., Yalçin-Mendi, Y. 1997. Clonal propagation of pistacia rootstocks by meristem and shoot culture. ***Acta Hortic.***, 441: 333-336.

Cheliak, W.M., Rogers, D.L. 1990. Integrating biotechnology into tree improvement programs. Canadian J. ***Forest Research,*** 20: 452–463.

Damasco, O.P., G.C. Graham, R.J. Henry, S.W. Adkins and 1.D. Godwin. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (Musa spp. AAA) bananas. ***Plant Cell Rep.,*** *16:118-123.*

D'Amato, F. 1985. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. ***CRC Crit Rev Plant Sci.,*** 3: 73–112.

Damiani, F., D. Mariotti, M. Pezotti and S. Arcioni, 1985. Variation among plants regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus* L. ***Z. Pflanzenzüchtg,*** 94: 332-339.

da Silva, T.C.R., Carvalho, C.R. 2014. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. ***In Vitro Cell Dev Biol Plant,*** 50(2): 158–165.

Davies, P., M. Pallotta, S. Ryan, W. Scowcroft and P.J. Larkin, 1986. Somaclonal variation in wheat: Genetic and cytogenetıc characterisation of alcohol dehyrdogenase 1 mutants. ***Theor Appl. Genet.,*** 72: 644-653.

De Klerk, G.J. 1990. How to measure somaclonalvariation. ***Acta bot. Neerl,*** 39(2): 129-144.

Delijam, M.A., Garoosi, G.A., Nezami-Alanagh, E. and Hosseini, R. 2016. Improving Pistacia vera micropropagation: with emphasis on the efficiency of minerals, vitamins and PGRs. ***Journal of Plant Molecular Breeding,*** 4(1): 43-54.

Deng, Z.N., Gentile, A., Nocolosi, E., Domina, F., Vardi, A., Tribulato, E. 1995. Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants with RAPD markers**. Journal of Horticultural Science,** 70, 117-125

Dennis, S.E., R. Brettell and W.J. Peacock, 1987. A tissue culture induced Adh 1 null mutant of maize results from a single base change. ***Mol. Gen. Genet.,*** 210: 181-183.

Dey, T., Saha, S., Ghosh, P.D. 2015. Somaclonal variation among somatic embryo derived plants evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. ***S Afr J Bot.,*** 96: 112–121.

Dogan, Y., Kafkas, S., Sutyemez, M., Akca, Y., Türemis, N. 2014. Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (Juglans regia L.) genotypes by three types of molecular markers. ***Sci. Hortic.,*** 168: 81–87.

Dolcet-Sanjuan, R. and Claveria, E. 1995. Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia Vera* L. and the beneficial effects of methyl jasmonate. ***Journal of the American Society for Horticultural Science,*** Vol 120, no:6, 93942.

Dollo, L., Hormaza, J.I., Polito, V.S. 1995. RAPD polymorphisms among *pistachio* (*Pistacia vera* L.) cultivars. ***Fruit Var J.,*** 49: 147–152.

Dollo, L. 1996. An isozyme study of Sicilian pistachio species varieties and offspring from artificial pollination. In: Caruso T, Barone E, Sottile F (eds) Proc 9th.

Donahue, R.A., Davis, R.T., Michler, C.H., Riemenschneider, D.E., Carter, D.R., Marquardt, P.E., Sanhkla, N., Haissig., B.E., Isebrands. J.G., 1994. Growth photosynthenis and herbicide tolerance of genetically modified hybrid poplar. ***Can J For Res.,*** 24: 237 - 238.

D'Onofrio, C., Lorenzis, G., Giordani, T.,Natali, L., Cavallini, A., Scalabrelli, G. 2010. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. ***Tree Genetic & Genom,*** Vol 6 p. 451- 466.

Duncan, R.R. 1997. Tissue culture-induced variation and crop improvement. ***Adv Agron.,*** 58: 201–240.

Dunstan, D.I. and Bethune, T.D., 1996. Variability in maturation and germination from white spruce somatic embryos, as affected by age and use of solid or liquid culture. ***In Vitro Cell Dev Biol,*** 32p: 165–170.

Driver, John and Kuniyuki, AH. 1984. In vitro propagation of Paradox Walnut root stock. ***HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science,*** 18. 506-509.

Edallo, S., Zucchinali, C., Perenzin, M. and Salamini, F. 1981. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with in vitro culture and plant regeneration in maize. ***Maydica,*** 26: 39-56.

Edson, J.L., Wenny, D.L., Leege-Brusven, A. 1994. Micropropagation of Pacific dogwood. ***Hortscience,*** 29: 1355–1356.

Eeuwens, C.J., Lord, S., Donough, C.R., Rao, V., Vallejo, G., Nelson, S. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 70: 311–323.

Eftekhari, M., Alizadeh, M., Mashayekhi, K., Asghari, H.R. 2012. *In vitro* propagation of four Iranian grape varieties: influence of genotype and pretreatment with arbuscular mycorrhiza. ***Vitis,*** 51: 175–182.

Ehsanpour, A.A., Tavassolı, M. and Arab, L. 2008. Sex determination of *Pistacia vera* L. using ISSR markers. ***Malays. Appl. Biol,***. *37 (2*): 25-28.

El-Oqlah, A.A. 1996. Biosystematic research on the genus *Pistacia* in Jordan. In:N Padulosi S, Caruso T, Barone E (eds) Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic resources. IPGRI, Palermo, Italy, pp: 12–19.

Etienne, H., Bertrand, B. 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. ***Tree Physiol.,*** 23: 419–426.

Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation—genetic basis and breeding applications. ***Trends Genet.,*** 5: 46–50.

Evans, D.A., and Sharp, W.R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. **S*cience,*** Vol. 221, Issue 4614, pp. 949-951.

FAO, 2014. FOA Stat, Pistachio Production. Available on http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E, accessed on 01 May 2017.

Farahani, F., Yari, R., Masoud, S. 2011. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Oleaeuropaea* subsp. *europaea*). ***Gene Conserve,*** 10: 216–221.

Farès, K., L. Guasmi, T. Touil and A. Ferchichi. 2009. Genetic diversity of pistachio tree using inter-simple sequence repeat markers ISSR supported by morphological and chemical marker. ***Biotechnology,*** 8 (1): 24-34.

Fascella, G., Airo, M., Zizzo, G.V., Ruffoni, B. 2004. Prime osservazioni sula coltivazione in vitro di Lentisco (*Pistacia lentiscus* L.). ***Italus Hortic,*** 11(4): 141–143.

Feijoo, M.C., Iglesias, I. 1998. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. sub sp. Aurantiaca Lainz, using *in vitro* culture. ***Plant Tissue Cult Biotechnol,*** 4: 87–94.

Ferguson, L., Beede, R., Ebstein, L., Buchner, R., Freeman, M., Cruz, H., Methney, P. 1994. California Pistachio Rootstock Trials California Pistachio Industry Annual Report Crop Year 1993 –1994. p. 60-63.

Ferguson, L., Sanden, B., Grattan, S., Epstein, L., Krueger, B., 2005. *Pistachio* root-stocks. In: Ferguson, L. (Ed.), Pistachio Production. University of California, pp.67–73.

Ferguson, C. J., Rueda, S., Cruz, A., Ferguson, D., Fritz, S., and Smith, S. 2008. Violent video games and aggression: Causal relationship or byproduct of family violence and intrinsic violence motivation?. ***Criminal Justice and Behavior,*** 35, 311–332.

Fernandez, M.E., Figueiras, A.M., Benito, C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. ***Theor Appl Genetics,*** 104: 845–851.

Fourre, J.L., P. Berger, I. Niquet and P. Andre. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. ***Theor Appl Genet.,*** 94:159-169.

Gamborg, O.L,Miller, R.A.,Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. ***Exp Cell Res.,*** Apr; 50(1): 151-8.

Garcia, S.R. 1980. Evaluacion de Tres Tipos de Injcrto en ol Pistachio. Beunavista, Sallitillo, Coahvila.

Garcia, E., Imbroda, I., Lorente, P., Marín, J.A., Arbeloa, A., Padilla, I.M.G., Barceló, A., Andreu, P. 2012. Micropropagation and in vitro grafting techniques to assist the selection of a pistachio rootstock from a population of terebinth (Pistacia terebinthus L.) collected in the SE of Spain. ***Acta horticulturae.,*** No.961. pp. 245-252

Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M., Sui, X., Wang, Q., Kimatu, J.N., Wang, L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrid* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. ***J Plant Growth Regul.,*** 29: 257–267.

Gentile, A., Monticelli, S., Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration in peach [Prunus persica (L.) Batsch]. ***Plant Cell Reports,*** *20*(11): 1011-1016.

George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. 2nd Edition. Exegetics Ltd. UK [A comprehensive book on the theory of plant tissue culture].

Ghaemmaghami, L., F. Attar and M. Rahiminejad, 2013. Distinctness and Inter Relationships of *Pistacia* L. Species in Iran as evidenced by retroelement insertional polymorphisms (IRAP Method). ***Iran. J. Bot.,*** 19: 78–85.

Godwin, I. D., Aitken, E. A., Smith, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. ***Electrophoresis,*** *18*(9): 1524-1528.

Golan-Goldhirsh, A., O. Barazani, Z. Wang, D. Khadka, J. Saunders, V. Kostiukovsky and J. Rowland, 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. ***Plant Systematics Evol.,*** 246: 9-18.

Gonzalez, A. and Frutos, D. J990. ln vilro culture or PisIaciol'era L. embryos and aged tree ex p[ants. Plalll Aging: Bosic and Appl. Approach. Plen/lm Publ. Corp. New York. pp. 335-338.

Goulão, L. and Olivera, C.M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. ***Euphytica,*** 122: 81–89.

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

Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr, Chandler, J.L. 1996. Somaclonal variation in sweet orange a tool for cultivar improvement. In: Proceedings of International Society of Citriculture VIII Congress, Sun City, South Africa, pp 203–206.

Guo, W., Gong, L., Ding, Z., Li, Y., Li, F., Zhao, S., Liu, B. 2006. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsislanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers. ***Plant Cell Rep.,*** 25: 896–906.

Guo, W., Wu, R., Zhang, Y., Liu, X., Wang, H., Gong, L., Zhang, Z., Liu, B. 2007. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsislanceolata* Benth. et Hook. f. ***Plant Cell Rep.,*** 26: 1297–1307.

Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. ***TAG Theoretical and Applied Genetics,*** *89*(7): 998-1006.

Gupta, P.K. 1998. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS, editors. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht: ***Kluwer Academic Publishers,*** pp. 149–168.

Hafez, E.E., Ghany, A.G.A.A., Zakil, E.A. 2006. LTR-retrotransposons based molecular markers in cultivated Egyptian cottons *G. barbadense*. ***Afr J Biotechnol,*** 5: 1200-4.

Hansman, D., Owens, Y.D.N.C. 1986. "Micropropagation of temperature nut trees". ***Horti. Abs.,*** 6: 403-416.

Hao, Y.J., Wen, X.P., Deng, X.X. 2004. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. ***J Plant Physiol.,*** 161: 479–484.

Harding, K., Benson, E.E. 2000. Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants

regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato***. CryoLetters,*** 21: 279-288

Harding, K., Benson, E. E. 2001. "The use of microsatellite analysis in Solanum tuberosum L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm", ***CryoLetters,*** 2: 199–208.

Hartmann, H.T., Kester D.E. 1983. Plant propagation: principles and practices. 4th edit., Englewood, New Jersey, USA, Prentice Hall, p: 727.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. Jr. Geneve, R.L. 1997. Plant Propagation Principles and Practices. 6th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 770 p.

Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F.A. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. ***Plant Cell Reports,*** 16, 624-627.

Heinze, D.J., and Mee, G. W. P., 1971. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones derived from tissue. ***Am. J. Bot.,*** 58: 257–262.

Heszky, L.E. and 1. Simon-Kiss, 1992. "Dama" the first plant veriety of biotechnology origin in Hungary, registrated in 1992. ***Hungarian Agric. Res.,*** 1: 30-32.

Heszky, L.E., J. Janovszky, G. Gyulaı, E. Kiss and L.T. Hangyel, 1993. Application of the partially sterile hybrid of *Agropyron repens* x *Brornus İnermis :* Callus initiation and plant regeneration. Proc. XII Intern. Grass. Cong., 1993. Vol. 1. 13-16 Feb., New Zealand, pp. 1048-1049.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. ***Proc Natl Acad Sci,*** USA., 93: 7783–7788.

Hokanson, K. E., Pooler, M. R. 2000. Regeneration of ornamental cherry (Prunus) taxa from mature stored seed. ***HortScience,*** *35*(4): 745-748.

Horáček, J., Švábová, L., Šarhanová, P., Lebeda, A. 2013. Variability for resistance to *Fusarium solani* culture filtrate and fusaric acid among somaclones in pea.***Biol Plant.,*** 57(1): 133–138.

Hormaza, J.I., Dollo, L. and Polıto, V.S., 1994a. Identification of a RAPD Marker Linked to Sex Determination in *Pistacia vera* Using Bulked Segregant Analysis. ***Theor. Appl. Genet.,*** 89: 9-13.

Hormaza, J.I., Dollo, L., Polito, V.S. 1994b. Determination of relatedness and geographic movements of *Pistacia vera* (*Pistachio*; *Anacardiaceae*) germplasm by RAPD analysis. ***Econ Bot.,*** 48 349–358.

Hormaza, J.I., Pinney, K., Polito, V.S. 1998. Genetic diversity of *pistachio* (*Pistacia vera*, Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. ***Econ Bot.,*** 52: 78–87.

Hormaza, J.I., Wünsch, A. 2007. "Pistachio, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Fruits and Nuts". ***Springer,*** Heidelberg, Berlin, pp: 4:243-251.

Hormaza, J.I., Wünsch A. 2011. *Pistacia*, Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits, Editor: Kole, C., ***Springer,*** Verlag Berlin Heidekberg. pp: 119-129.

Hossain, M.M., Kant, R., Van, P.T., Winarto, B., Zeng, S., Teixeira da Silva, J.A. 2013. The application of biotechnology to orchids. ***Crit Rev Plant Sci.,*** 32(2): 69–139.

Hu, X., Xu, Q. 2010. Morphological Variations of somaclone regenerated from series tissue culture of *Gloxinia*. ***Acta Agric Boreal Occident Sin.,*** 5:39.

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

Ibrahim Basha, A., Padulosi, S., Chabane, K., Hadj-Hasan, A., Dulloo, E., Pagnotta, A.M., Porceddu, E. 2007. Genetic diversity of Syrian pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties evaluated by AFLP markers***. Genet. Res. Crop Evol.,*** 54: 1807-1816.

Iruela, M., Rubio, J., J.I. Cubero, Gil, J., Millán, T. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. ***Theor Appl Genet,*** 104: 643–651.

Israeli, Y., Lahav, E., Reuveni, O. 1995. *In vitro* culture of bananas. In: Gowen S, editor. Bananas and plantains. London: Chapman and Hall, pp. 147–178.

Koç¸ İ., Akdemir H., Onay, A.,Ozden-Çiftçi, Y. 2014. Cold-induced genetic instability in micropropagated Pistacia lentiscus L. ***Plantlets, Acta Physiol Plant,*** 36: 2373–2384.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223–270.

Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. ***Euphytica,*** 118: 153–166.

Jain, S.M., Gupta, P.K., and Newton, R.J., 1995. Somatic embryogenesis in woody plant, ***Kluwer Academic Publishers,*** Dordrecht, Boston, London.

Jain, S.M. and Ishii, K. 1998. Recent advances in somatic embryogenesis in forest tree. In: Recent Advances in Biotechnology for Conservation and Management. (eds. S.H. Mantell, S. Bruns, C. Tragardh and A.M. Viana). Stockholm: International Foundation for Science.

Jaligot, E., Beulé, T., Rival, A. 2002. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. ***TAG Theoretical and Applied Genetics,*** *104*(8): 1263-1269.

Jaligot, E., Beule, T., Verdeil, J.L., Tregear, J., Rival, A. 2003. DNA methylation vs. somaclonal variation in higher plants: Oil palm as a case study. ***Acta Horticulturae,*** 625. 345-353.

Jaligot, E., Adler, S., Debladis É., Beulé T., Richaud, .F, Ilbert, P., Finnegan, E.J. 2011. Rival A. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeisguineensis*. ***Ann Bot.,*** 108: 1453–1462.

Jevremović, S., Subotić, A., Miljković, D., Trifunović, M., Petrić, M., Cingel, A. 2012. Clonal fidelity of *Chrysanthemum* cultivars after long term micropropagation by stem segment culture. ***Acta Hortic.,*** 961: 211–216.

Joley, L.E. 1960. Experiment with propagation of the genus *Pistacia*. ***Proc Inter Prop Soc***, 10: 287-292.

Joley, L.E. 1969. Pistachio. In: Jaynes RA (Ed.) Handbook of North American nut trees. ***Northern Nut Growers Assoc.,*** Knowville, pp: 384-361.

Joley, L.E. and Opitz, K.W. 1971. Further experiments with propagation of *Pistacia*. ***Proc Inter Plant Prop Soc.,*** 21: 67-76.

Joley, L. E. 1973. Hard shelled nuts (Pistachio), (Translation). Ministry of Agriculture, Agricultural DirectoretePublications, 154 Ankara.

Jonard, R. 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. Biotechnology in agriculture and forestry, Editor: Bajaj, Y.P.S., Trees I. ***Springer-Verlag,*** Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp:31–48.

Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal, R. K., Ranjekar, P. K., & Brar, D. S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza. ***TAG Theoretical and Applied Genetics,*** *100*(8): 1311-1320.

Joshi, P., Dhawan, V. 2007. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. ***Biol Plant,*** 51: 22–26.

Joyce, S.M., Cassells, A.C., Jain, S.M. 2003. Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 74: 103–121.

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. ***Plant Mol Biol.,*** 43: 179–188.

Kafkas, S. and Kaska, N. 1997. The effects of scarification, stratification and GA3 treatments on the germination of seeds and seedling growth in selected *P. khinjuk* types. ***Acta Hort.,*** 470: 454-459.

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

Kafkas, S., Kaşka, N. and Perl-Treves, R., 2000. Unusual *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) Monoecious Sex Types in the Yunt Mountains of the Manisa Province of Turkey. ***Israel Journal of Plant Sciences,*** 48(4), 277-280.

Kafkas, S. and Perl-Treves, R., 2001. Morphological and Molecular Phylogeny of *Pistacia* Species in Turkey. ***Theor. Appl. Genet.,*** 102(6-7): 908-915.

Kafkas, S., Çetiner, S. and Perl-Treves, R., 2001. Development of Sex- Associated RAPD Markers in Wild *Pistacia* Species. ***Journal of Horticultural Science & Biotechnology,*** 76(2): 242-246.

Kafkas, S. and Perl-Treves, R., 2002. Interspecific Relationships in *Pistacia* Based on RAPD Fingerprinting. ***HortScience,*** 37(1): 168-171.

Kafkas, S., Kafkas, E. and Perl-Treves, R., 2002. Morfological Diversity and a Germplasm Survey of Three Wild *Pistacia* Species in Turkey. ***Genetic Resources and Crop Evolution,*** 49: 261-270.

Kafkas, S. 2003. Developing of Monoecious Pistachio (*P. vera* L.) Populations and the Sex Determination Mechanism in *Pistacia* by Crossbreeding. III.

Kafkas, S., Acar I. and Gozel H., 2003. A Project on Developing Monoecious Pistachio (*Pistacia vera* L.) Populations and Determination of Sex Mechanism in *Pistachia*. XIII GIEMPA Meeting on Almonds and Pistachios. Options Mediterraneennes, 63: 57–60.

Kafkas, S., Ozkan, H., Ak, B. E., Acar, I., Atli, H. S., Koyuncu, S. 2006. Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. ***Journal of the American Society for Horticultural Science,*** *131*(4): 522-529.

Kafkas, S. 2006. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* by AFLP markers. ***Plant Systems and Evolution,*** 262(1–2): 113–124.

Kafkas, S., Kaşka, N., Wassimi, A.N. and Padulosi, S. 2006a. Molecular characterisation of Afghan pistachio accessions by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). ***Journal of Horticultural Science & Biotechnology,*** 81(5): 864-868.

Kafkas, S.**,** Ozkan, H., Ak, B.E., Acar, İ., Atli, H.S. and Koyuncu, S. 2006b. Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide Pistachio (*Pistacia vera* L) Germplasm:

Comparison of AFLP ISSR and RAPD Markers. ***Journal of the American Society for Horticultural Science,*** 13(4): 522-529.

Kafkas, S., M. Khodaeiaminjan, M. Güney and E. Kafkas. 2015. Identification of sex-linked SNP markers using RAD sequencing suggests ZW/ZZ sex determination in *Pistacia vera* L. ***BMC Genomics,*** 16(98).

Kaity, A., Ashmore, S.E., Drew, R.A. 2009. Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones. ***Plant Cell Rep.,*** 28: 1421–1430.

Kalender, W. A., Polacin, A. 1991. Physical performance characteristics of spiral CT scanning. ***Medical physics,*** *18*(5): 910-915.

Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. ***Theoretical and Applied Genetics,*** *98*(5): 704-711.

Kalendar, R., and Schulman, A.H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. ***Nat. Protoc.,*** 1(5): 2478-2484.

Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E., 1995. Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. ***Mol Breed.,*** 1: 365–373.

Kar, B., Kuanar, A., Singh, S., Mohanty, S., Joshi, R.K., Subudhi, E., Nayak, S. 2014. *In vitro* induction, screening and detection of high essential oil yielding somaclones in turmeric (*Curcuma longa* L.). ***Plant Growth Regul.,*** 72(1): 59–66.

Karımı, H.R., Kafkas, S., Zamanı, Z., Ebadı, A. and Moghadam, M.R.F., 2009. Genetic Relationship Among Species and Cultivars of *Pistacia* using AFLP Markesr. ***Plant Syst. Evol.,*** 279: 21-28.

Karimi, H.R., Kafkas, S. 2011. Genetic relationships among Pistacia species studied by SAMPL markers. ***Plant Syst Evol.,*** 297: 207–212.

Karp, A. and S.E, Maddock, 1984. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. ***Theor. Appl. Genet.,*** 67: 249-255.

Karp, A. and Bright, S.W.J. 1985. On the causes and origins of Dordrecht, 1988, pp. 183-189. f somaclonal variation. ***Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.,*** 24 H. L/Srz, Variability in tissue culture derived plants, in: W. 2 (1985) 199-234.

Karp, A. 1992. The role of growth regulators in somaclonal variation. ***Br Soc Plant Growth Regul Annu Bull.,*** 2: 1–9.

Karp, A. 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA, editors. Plant cell and tissue culture. Dordrecht: ***Kluwer Academic Publishers,*** pp. 139–152.

Karp, A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. ***Euphytica,*** 85: 295–302.

Kaska N., Ak. B.E., Nikpeyma Y. 1990. Application of chip, patch and spring-fall shiel budding on different Pistacia species, Turkiye I. Antepfıstığı Sempozyumu Bildirileri, pp: 59-67.

Kaşka, N., Türemiş, N., Kafkas, S., 1995. Çileklerde tüplü ve frigo fide kullanımının yüksek tünelde meyve üretimi üzerine etkileri. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt:1(Meyve), 311-316, Adana.

Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., Loukas, M. 2003 Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. ***Euphytica,*** 132: 279–86.

Kebour, D., Boutekrabt, A., and Mefti, M. 2012. Using ISSR markers to study genetic polymorphism of pistachio (*Pistacia vera* L.) in Algeria. ***E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research,*** Vol. 3(3), pp. 47-53.

Kesawat, M.S. and B.K Das, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. ***J. Crop Sci. Biotech.,*** 12 (4),169 -181.

Khan, S., Saeed, B., Kauser, N. 2011. Establishment of genetic fidelity of in vitro raised banana plantlets. ***Pak J Bot.,*** 43:233–242.

Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden- Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., 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,*** Volume 75, Issue 1, pp 75–88.

Kırdök, E. and Özden Çiftçi, Y. 2014. Retrotransposon Marker Systems as a Tool to Analyze Molecular Diversity of Mediterranean *Pistacia* Species. ***International Journal Of Agriculture & Biology,*** ISSN Print: 1560–8530.

Kırdök, E. 2016. Retrotranspozona Dayalı Marker Sistemleri Kullanarak Pıstacıa Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.

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

Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N. 2010. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. ***Biotechnol Adv.,*** 28(1): 35–48.

Kovach, W.L. 1999. MVSP—a multivariate statistical package for Windows, ver 3.1. Pentraeth: Kovach Computing Services.

Krikorian, A.D., Irizarry, H., Cronauer-Mitra, S.S., Rivera, E. 1993. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa*AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips in vitro. ***Ann Bot.,*** 71: 519–535.

Krishna, H, Singh, SK, Sharma, R.R, Khawale, R.N, Minakshi, Patel, V.B. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during *ex vitro* acclimatization. ***Sci Hortic.,*** 106: 554–567.

Krishna, H., Singh, S.K. 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement—a review. ***Biotechnol Adv.,*** 25: 223–243.

Krishna, H., Sairam, R.K, Singh, S.K., Patel, V.B., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L., Sachdeva, A. 2008. Mango explants browning: effect of ontogenic age: mycorrhization and pre-treatments. ***Sci Hortic.,*** 118:132–138.

Krishna, H., Singh, D. 2013. Micropropagation of *lasora* (*Cordia myxa* Roxb.) ***Indian J Hortic.,*** 70: 323–327.

Krishna-pillay, Daniel. 2000. Silviculture and management of teak plantations. UNASYLVA-FAO-. 201. 14-21.

Krueger, B. and Ferguson, L., 1995. Pistachio Production (The Orchard). Cooperative Extention, Unv. of Calf. Oakland. California. p. 41-42.

Kuhn, B.C., Manzatti, J.S., Pepinelli, A., Carnelossi, P.R., Rodrigues de Souto, E., Mangolin, C.A., Pires da Silva Machado, M.F. 2017. Clonal micropropagation of news cassava varieties assisted by inter-retrotransposon amplified polymorphism and retrotransposon-microsatellite

amplified polymorphism markers. ***International Journal of Current Research,*** Vol. 9, Issue, 01, pp.45295-45301.

Kuksova, V.B., Piven, N.M., Gleba, Y.Y. 1997. Plant cell variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 49: 17–27.

Kumar, S., Ramkrishna, D. 1996. On the solution of population balance equations by discretization—I. A fixed pivot technique. ***Chemical Engineering Science,*** *51*(8): 1311-1332.

Kumar, A., Bennetzen, J. L. 1999. Plant retrotransposons. ***Annual review of genetics,*** *33*(1): 479-532.

Kuru, C., Uygur, N., Tekin, H., Karaca, R. Akkök, F. ve Hanci, G., 1986. Antepfıstığı Yetiştiriciliği ve Mücadelesi. Tar. Or. ve Köyişleri Bak. Pro. ve Uyg. Gen. Müd. ***Gaziantep Zirai Araşt. Enst. Yay.,*** No.2. 20 s.

Kuznetsova, O.I., Ash, O.A., Gostimsky, S.A. 2006. The effect of the duration of callus culture on the accumulation of genetic alternation in pea *Pisum sativum* L. ***Russ J Genet.,*** 42: 555–562.

Landsmann, J, and H. Uhrig, 1985. Somaclonal variation in *Soianum îuberosum* detected at the molecular level. ***Theor. Appl. Genet.,*** 71: 500-505.

Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Gill, B.S. 1984. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. ***TAG Theoretical and Applied Genetics,*** *68*(6): 547-554.

Lapitan, N.L.V., Sears, R.G. and Gill, B.S. 1988. Amplification of repeated DNA sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. ***Theor. Appl. Genet.,*** 75: 381-388.

Larkin, P.J., and Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation -a novel source of variabilitiy from celi culture for plant improvemenet. ***Theor. Appl. Genet,*** 60: 197-214.

Larkin, P.J., Ryan, S. R. Brettel and Scowcroft, W. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. ***Theor. Appl. Genet.,*** 67: 443-455.

Larkin, P.J., Banks, P.M., Bhati, R., Brettell, R.I.S., Davies, P.A., Ryan, S.A., 1989. From somatic variation to variant plants – mechanisms and applications. ***Genome,*** 31: 705–711.

Larkin, J.C, Hunsperger, J.F., Culley, D., Rubenstein, I., Silflow, C.D. 1989. The organization and expression of a maize ribosomal protein gene family. ***Genes Dev.,*** 3: 500-509.

Lee, S., Jong-Hwa, K., Kyong-Cheul, P., Nam-Soo, K. 2014. LTR-retrotransposons and inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) analysis in Lilium species. ***Genetica,*** DOI 10.1007/s10709-015-9833-6.

Leple, J.C., Brasileiro, A.C.M., Michel, M.C., Delmotte, F., Jouanin, L. 1992. Transgenic poplars/expression chimeric genes using four different constructs. ***Plant Cell Rep.,*** 11: 137 - 141.

Leva, A.R., Petruccelli, R., Rinaldi, L.M.R. 2012. Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In: Leva AR, Rinaldi LMR, editors. Recent advances in plant in vitro culture. ***Croatia: INTECH Open Access Publisher,*** pp. 123–150.

Levee, V., Lelu, M.A., Jouanin, L.D., Pilate, C.G. 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* X *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. ***Plant Cell Rep.,*** 16: 680–685.

Lin, T.S., Crane, J.C., Ryugo, K., Polito, V.S., Dejong, T.M. 1984. Comparative study of leaf morphology, photosynthesis and leaf conductance in selected *Pistacia* species. ***J Am Soc Hortic Sci.,*** 109: 325–330.

Linacero, R., Rueda, J., Esquivel, E., Bellido, A., Domingo, A, Vázquez, A.M. 2011. Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants. ***In Vitro Cell Dev Biol Plant.,*** 47: 618–628.

Lloyd, G. and B.H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (Kalmia latifolia) by use of shoot tip culture. ***Int. Plant Prop. Soc.,*** Comb. Proc., 30: 421-427.

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

Lo Schiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as cased by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. ***Theor Appl Genet.,*** 77:325–331

Louskas, M., Pontikis, C.A. 1979. Pollen isozyme polymorphism in types of *Pistacia vera* and related species as aid in taxonomy. ***J Hortic Sci.,*** 54:95–102.

Lucia, G., Castiglione, M.R., Turrini, A., Ronchi, V.N., Geri, C. 2011. Cytogenetic and histological approach for early detection of "mantled" somaclonal variants of oil palm regenerated

by somatic embryogenesis: first results on the characterization of regeneration system.***Caryologia,*** 64(2): 223–234.

Mallaya, N.P, Ravishankar, G.A. 2013. *In vitro* propagation and genetic fidelity study of plant regenerated from inverted hypocotyl explants of eggplant (*Solanum melongena* L.) cv. Arka Shirish. 3 Biotech., 3(1): 45–52.

Mante, S., Scorza, R., Cordts, J. M. 1989. Plant regeneration from cotyledons of Prunus persica, Prunus domestica, and Prunus cerasus. ***Plant cell, tissue and organ culture,*** *19*(1): 1-11.

Marchetti, S., Ancora, G.and Brunor, A. 1976. Time course of polyplodisation in calli derived from stem and pith explants of *Nıcotiana tabacum* studied on isolated nuclei. ***Z. Pflanzenphysiol.,*** 78: 307-312.

Marin, J.A., Garcia, E., Lorente, P., Andreu, P. and Arbeloa, A., 2016. A novel approach for propagation of recalcitrant pistachio cultivars that sidesteps rooting by ex vitro grafting of tissue cultured shoot tips. ***Plant Cell Tiss Organ Cult.,*** 124 (1): 191-200.

Markert, C. L., and Hunter, R. L. 1959. The distribution of esterases in mouse tissues. ***Journal of Histochemistry & Cytochemistry,*** *7*(1): 42-49.

Martinelli, A. 1988. Use of *in vitro* techniques for selection and cloning of different *Pistacia* species. ***Acta Hort.,*** 227: 331-333.

Martins, M., Sarmento, D., Oliveira, M.M. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. ***Plant Cell Rep.,*** 23(7): 492–496.

Mascarello, C., Fascella, G., Zizzo, G.V., Mantovani, E., Ruffoni, B. 2007. *In vivo* and *in vitro* propagation of *Pistacia lentiscus* L. Proc. XXVII IHC-S10 Plant Biotechnology. In: Chief Read PE (ed) ***Acta Hortic.,*** vol 764, ISHS, pp 299–306.

Mathur, S. 2013. Conservation of biodiversity through tissue culture. ***Res Rev J Microbiol Biotechnol.,*** 2: 1–6.

Matos, M., Pinto-Carnide, O., Benito, C., 2001. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. ***Hereditas,*** 134(3): 229–236.

Matsuda, S., Sato, M., Ohno, S. 2014. Cutting leaves and plant growth regulator application enhance somaclonal variation induced by transposition of VGs1 of *Saintpaulia*. ***J Jpn Soc Hortic Sci.,*** 83(4): 308–316.

Mc Coy, H. G., Cipolle, R. J., Ehlers, S. M., Sawchuk, R. J., Zaske, D. E. 1979. Severe methanol poisoning: application of a pharmacokinetic model for ethanol therapy and hemodialysis. ***The American journal of medicine,*** *67*(5): 804-807.

Mc Coy, T.J., R.L. Phillips and H.W. Rines, 1982. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures: high frequency of partial chromosome loss. Can. ***J. Genet. Cytol.,*** 24: 37-50.

Mc Gregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (Solanum tuberosum L.) germplasm. ***Euphytica,*** 113: 135–144.

Mederos, S. and I. Carreño. 1991. *In vitro* organogenesis of *Pistacia vera* L. cv Mateur. ***In Vitro Cell. Dev. Biol.,*** 27(3): 108.

Mehta, Y.R. and Angra, D.C. 2000. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. ***Genet. Mol. Biol.,*** 23: 617-622.

Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies—the next generation***. Nat Rev.,*** 2010(1): 31–46.

Michailides, T.J., Ogawa, J.M., MacDonald, J.D., Ferguson, L. 1988. Symptoms of fungal diseases of pistachios in California. California Pistachio Industry, Grower's Leaflet 3.

Miguel, C., Marum, L. 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro* somaclonal variation and beyond. ***J Exp Bot.,*** 62: 3713–3725.

Miler, N., Zalewska, M. 2014. Somaclonal variation of chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types. ***Acta Sci Pol Hortorum Cultus.,*** 13(2): 69–82.

Mirzaei, S., Bahar, M,, Sharifnabi, B. 2005. A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD marker. ***Acta Horticult.,*** 726: 39-43.

Mitchell, J.D. and Mori, S.D. 1987. The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaecae*). ***Mem NY Bot Gard.,*** 42:1-76.

Miyao, A., Nakagome, M., Ohnuma, T., Yamagata, H., Kanamori, H., Katayose, Y., Takahashi, A., Matsumoto, T., Hirochika, H. 2012. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing. ***Plant Cell Physiol.,*** 53: 256–264.

Modgil, M., Mahajan, K., Chakrabarti,S.K., Sharma, D.R., Sobti, R.C. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. ***Scientia Horticulturae,*** 104, 151-160.

Mohanty, S., Parida, R., Singh, S., Joshi, R.K., Subudhi, E., Nayak, S. 2011. Biochemical and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown *Kaempferia galanga*. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 106: 39–46.

Morcillo, F., Gagneur, C., Adam, H., et al. 2006. Somaclonal variation in micropropagated oil palm: characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. ***Tree Physiology,*** 26: 585–594.

Morozova, O., Marra, M.A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. ***Genomics,*** 92: 255–264.

Mujib, A., Banerjee, S., Dev Ghosh, P. 2007. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). ***Propag. Ornam. Plants,*** 7: 169–174.

Muleo, R., Iacona, C., Pistelli, L., Loreti, F. 2006. A novel Mr. S. 2/5 peach rootstock clone tolerant to flooding stress. ***Adv Hortic Sci.,*** 20: 208–214.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiol Plant,*** 15: 473–497.

Nafziger, E., Widholm, J., Steinrucken, H., Killmer, J. 1984. Selection and characterisation of a carrot celi line tolerant to glyphosate. ***Plant Physiol.,*** 76: 571-574.

Nagaoka, T. and Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. ***Theor Appl Genet.,*** 94: 597-602.

Nair, A.S., Teo, C.H., Schwarzacher, T. et al. 2005. Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. ***Euphytica,*** 144: 285.

Naseer, S., Mahmood, T. 2014. Tissue culture and genetic analysis of somaclonal variations of *Solanum melongena*L. cv. Nirrala. ***Cent Eur J Biol.,*** 9(12): 1182–1195.

Nayak, S., Kaur, T., Mohanty, S., Ghosh, G., Choudhury, R., Acharya, L., Subudhi, E. 2010. *In vitro*and *ex vitro*evaluation of long-term micropropagated turmeric as analyzed through cytophotometry, phytoconstituents, biochemical and molecular markers. ***Plant Growth Regul.,*** 64: 91–98.

Navinder, S., Neelu, J., Sunita, J. and Rajinder, K.J. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. ***Euphytica,*** 140: 133–146.

Ngezahayo, F., Dong, Y., Liu, B. 2007. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryzasativa*L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. ***J Appl Genet.,*** 48: 329–336.

Nhut, D. T., Hanh, N. T. M., Tuan, P. Q., Tram, N. T. H., Chinh, N. C., Nguyen, N. H. 2006. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of Lilium longiflorum. ***Scientia horticulturae,*** 1110(1): 93-97.

Nhut, D.T., Hai, N.T., Thu, P.T.M., Thi, N.N., Hien, T.T.D., Tuan, T.T., Nam, N.B., Huy, N.P., Chien, H.X., Jain, S.M. 2013. Protocol for inducing flower color somaclonal variation in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) ***Methods Mol Biol.,*** 11013: 455–462.

Nivas, S.K., DSouza, L. 2014. Genetic fidelity in micropropagated plantlets of *Anacardium occidental* L. (Cashew) an important fruit tree. ***Int J Sci Res.,*** 3: 2142–2146.

Noroozi, S., Baghızadeh, A. and Javaran, M.J., 2009. The Genetic Diversity of Iranian Pistachio (*Pistacia vera* L.) Cultivars Revealed by ISSR Markers. ***Biological Diversity and Conservation (BioDiCon),*** 2(2): 50-56.

Nwauzoma, A.B., Jaja, E.T. 2013. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. ***J Appl Biosci.,*** 67: 5252–5260.

Onay, A., Jeffree, C.E., Yeoman, M.M. 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L.. ***Plant Cell Rep.,*** 15.

Onay, A., 1996. *In vitro* organogenesis and embryogenesis of pistachio, *Pistacia vera* L. (Ph.D. Thesis), University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

Onay, A. and Jeffree, C.E. 2000.Somatic Embryogenesis in Pistachio (*Pistacia vera* L.). ***Somatic embryogenesis in woody plants,*** 361-390.

Onay, A. 2000a. "Micropropagation of Pistachio from mature trees". ***Plant Cell. Tiss. Org. Cult.,*** 60. 159-162.

Onay, A. 2000b. "Somatic embryogenesis in cultured kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L. cv Siirt", Proceedings of the 2nd Balkan Botanical Congress, Volume II, Istanbul, pp: 109-115.

Onay, A. 2003. Micropropagation of pistachio, In: Micropropagation forest trees and fruits, Forestry Sciences Vol.75, Editor: Mohan Jain S., Ishii K. ***Kluwer Academic Publishers,*** The Netherlands. Section C: pp:565-588.

Onay, A., Pirinç, V., Işıkalan, C., Adıyaman, F., Tilkat, E. ve Başaran, D. 2003. *In vivo* and in vitro micrografting of *pistachio, Pistacia vera* L. cv."Siirt". ***Tur. J Biol.,*** 27: 95-100.

Onay, A., Pirinç, V., Yıldırım, H., Başaran, D. 2004. *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* L. var. Siirt.) ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture,*** Vol 77.2: 215-219.

Onay, A. 2005. Pistachio, *Pistacia vera* L., Protocols for Somatic Embryogenesis In Woody Plants, Editors: Mohan Jain S., Gupta, P., ***Kluwer Academic Publishers,*** The Netherlands. pp: 289-300.

Onay, A., Tilkat, E., Işıkalan, Ç., Namlı, S. 2007. Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Editors: Mohan Jain S., Haggman H., ***Springer Netherlands,*** pp:289-298.

Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö., Kılınç, F. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut Ve Gelecekteki Durum. Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi, 1 (2), 11-28. Retrieved from http://dergipark.gov.tr/buyasambid/issue/29823/320804.

Ostry, M., Hackett, W., Michler, C., Serred, R., McCown, B. 1994. Influence of regeneration method and tissue source on the ' -frequency of somatic variation in Populus to infection by Septoria musiva. ***Plant Science,*** 97 (1994) 209-215.

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

Özden-Tokatli, Y., Özüdoğru, E.A., Akcin, A. 2005. In vitro response of pistachio nodal explants to silver nitrate. ***Sci. Hortic.,*** vol.106, issue 3, p.415-426.

Ozden Tokatli, Y., Akdemir, H., Tilkat, E., Onay, A. 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. ***Biotechnology Advances,*** 28: 130–141.

Özbek, S. and Ayfer, M., 1958. An Hermaphrodite *Pistachio* Found in the Vicinity of Antep, Turkey. ***Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.,*** 72: 240-241.

Özbek, S. and Ayfer, M. 1959. Türkiye'de Antepfıstığı (*Pistacia vera L.*) anaçları ve aşı tekniği. ***AÜ Zir. Fak. Yayınları,*** 14(4): 189-214.

Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. ÇÜZF Yayın No: 28, Ders Kitabı No: 11, Adana. 486s.

Özçağıran, R., 1974. Meyve Ağaçlarında Anaç İle Kalem Arasındaki Fizyolojik İlişkiler. ***E.Ü. Ziraat Fak. Yay.,*** No: 243 Bornova. 45 s.

Özçağıran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M. 2005. Ilıman iklim Meyve Türleri: Sert çekirdekli meyveler. ***Ege Üniversitesi Yayınları,*** 1:553 s 208.

Panda, M.K., Mohanty, S., Subudhi, E., Acharya, L., Nayak, S. 2007. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analysis. ***Int J Integr Biol.,*** 1(3): 189–195.

Parasnis, A.S., Ramakrishna, Chowdari, W.K.V., Gupta, V.S. and Ranjekar, P.K. 1999. Microsatellite (GATA)n reveals sex-specific differences in Papaya. ***Theor. Appl. Genet.,*** 99: 1047–1052.

Parfıtt, D.E., Almehdi, A., 1994. Use of high CO2 atmosphere and medium modifications for the successful micropropagation of Pistachio. ***Scientia Horticulturae,*** 56: 321-329.

Parfitt, D.E., Badenes, M.L. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 94: 7987–7992.

Parfitt, D.E. 2003. "Bonsai" ornamental pistachio. ***HortScience.,*** 38: 1260–1261.

Pathak, H., Dhawan, V. 2012. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. ***In Vitro Cell Dev Biol Plant.,*** 48: 137–143.

Patzak J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. ***Euphytica,*** 131(3): 343–350.

Paulo, M.R., Claudete, F.R., Leandro R., Valdemar, P.C., Eduardo, A.R. Tumoru, S. 2003. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. ***Genet. Mol. Biol.,*** 26: no.3.

Pazouki, L., Salehi Shanjani, P., Hagidimitrion, M., Pirseyedi, S.M., Naghavi, M.R., Avanzato, D., Quarta, R., Kafkas, S., Ghareyazie, B., Ghaffari, M.R., Khayam Nekoui, S.M., Mardi, M. 2009. Genetic diversity and relationships among Pistacia species and cultivar. 5th international symposium on Pistachio and Almonds. Abstract book. Saliurfa, Turkey, p 81

Pérez, G., Yanez, E., Isidrón, M., Lorenzo, J.C. 2009. Phenotypic and AFLP characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 96: 113–116.

Pérez G, Mbogholi A, Sagarra F, Aragón C, González J, Isidrón M, Lorenzo JC. 2011. Morphological and physiological characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. ***In Vitro Cell Dev Biol Plant.,*** 47: 428–433.

Petolino, J., Welter, M. and Cai, C. 2003. Whisker-mediated transformation of maize. In: Jakson, J.F. and Linskens, H.F. (eds.). Moleculer Methods and Plant Analysis. Vol. 23. ***Springer-Verlag,*** Berlin. pp. 147-158.

Phillips, R.L., Kappler, S.M., Olhof, R. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 91: 5222–5226.

Piagnani, M.C., Chiozzotto, R. 2010. Shoot regeneration, in vitro performances of regenerated shoots and transient expression in morphogenic explants in *Prunus avium* cultivar 'Burlat C1'. ***Eur J Hortic Sci.,*** 3: 132–138.

Pierik, R.L.M., 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. ***Martinus Nijhoff Publ***., Dortrecht, Netherlands, p. 344.

Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. 2012. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species—A review (2001-2011), 5-51.

Polat, A.A. and Calıskan, O., 2006. Growth and fruit quality of some foreign loquat cultivars in the subtropical climate of the Turkish Mediterranean region. ***J. Amer. Pom.,*** 60: 1 69-177.

Pontikis, C.A. 1984. *In vitro* propagation of *Pistacia terebinthus* L. ***Plant Propagator,*** 30: 14–5.

Pospíšılová, J., Tıchá,I., Kadleček, P., D. Haısel, D. and Plzáková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. ***Bıologıa Plantarum,*** 42 (4): 481-497.

Prado, M.J., Gonzalez, M.V., Romo, S., Herrera, M.T. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 88(1): 1–10.

Predieri, S. 2001. Induced mutation and tissue culture in fruits. ***Plant Cell Tiss. Org. Cult.,*** 64: 185–210.

Prevost, A. and Wilkinson, M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. ***Theor Appl Genet.,*** 98: 107–112.

Quoirin, M.; Lepoivre, P.; Boxus, P. 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux. C. R. Rech., Stn. Cult. Fruit. Maraîchères Gembloux. 93–117; 1977.

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.

Ramulu, K., Dijkhuis, P., Roest, S., Bokelmann, G. S., Groot, B. D. 1986. Variation in phenotype and chromosome number of plants regenerated from protoplasts of dihaploid and tetraploid potato. ***Plant breeding,*** *97*(2): 119-128.

Ravindra, N.S., Ramesh, S.I., Gupta, M.K., Jhang, T., Shukla, A.K., Darokar, M.P., Kulkarni, R.N. 2012. Evaluation of somaclonal variation for genetic improvement of patchouli (*Pogostemonpatchouli*), an exclusively vegetatively propagated aromatic plant. ***J Crop Sci Biotechnol.,*** 15: 33–39.

Ray, T., Dutta, I., Saha, P., Das, S., Roy, S.C. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 85(1): 11–21.

Reddy, M. P., Sarla, N., Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. ***Euphytica,*** 128, 9–17.

Reisch, B., Bingham, E. T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures: variation in growth and morphological characteristics. ***Crop Science,*** *21*(5): 783-788.

Reuveni, O., İsraeli, Y. 1990. Measures to reduce somaclonal variation in in-vitro propagated bananas. ***Acta. Hortic.,*** 275: 30313.

Rival, A., Ilbert, P., Labeyrie, A., Torres, E., Doulbeau, S., Personne, A., Dussert, S., Beulé ,T., Durand-Gasselin, T., Tregear, J.W., Jaligot, E. 2013. Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. ***Plant Cell Rep.,*** 32: 359–368.

Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publishing Ltd.

Roldan-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., van Eijk, M. J. T., & De Loose, M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (Lolium) varieties. 2. AFLP characterization. ***Molecular Breeding,*** 6: 593–602.

Roth , C.W., Kobeski, F.,Walter, M.F., Biessmann, H. 1997. Chromosome end elongation by recombination in the mosquito Anopheles gambiae. ***Mol Cell Biol.,*** 1997 Sep;17(9):5176-83.

Roux, N.S., Tolaza, A., Dolezel, J., Panis, B. 2004. Usefulness of embryogenic cell suspencion cultures fort he induction and selection of mutant Musa spp. In: Jain, S.M., Swennen, R. (eds). Banana improvement: cellular moleculer biology and induced mutation. ***Science,*** Enfield, pp. 33-43.

Rovira, M., Battle, I., Romero, M., Vargas, F.J. 1998. Characterization of pistachio cultivars using isozymes. ***CIHEAM Cah Options Mediterr.,*** 33: 113–120.

Rugini, E. and Verma, D.C. 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (Prunus amygdalus, Batsch) cultivar. Centro di Studio per la Olivicoltura CNR, Perugia (Italy) [Corporate Author]Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Rome (Italy). Incontro frutticolo su "frutta secca" e mostra pomologica. 6. Convegno pomologico. Caserta (Italy).

Ryan, S.A., P.J. Larkin and F.W. Eliison, 1987. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wbeat. ***Theor. Appl. Genet***., 74: 77-82.

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.

Sahijram, L., Soneji, J., Bollamma, K.. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa*spp.). ***In Vitro Cell Dev Biol Plant.,*** 39: 551–556.

Sales, E.K., Butardo, N.G. 2014. Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. ***Int J Biol Vet Agric Food Eng.,*** 8: 63–610.

Sanputawong, S., Te-Chato, S. 2011. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) ***J Agric Technol.,*** 7(2): 531–545.

Sato, M., Kawabe, T., Hosokawa, M., Tatsuzawa, F., Doi, M. 2011. Tissue culture-induced flower color changes in Saintpaulia caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 30, 50 hydroxylase (F3050H) promoter. ***Plant Cell Rep.,*** 30: 929–939.

Sato, I., Shimatani, K., Fujita, K., Abe, T., Shimizu, M., Fujii, T., Hoshino, T., Takaya, N. 2011a. Glutathione reductase/glutathione is responsible for cytotoxic elemental sulfur tolerance via polysulfide shuttle in fungi. ***J Biol Chem.,*** 286(23): 20283-91

Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures**.** ***Canadian Journal of Botany,*** 50(1): 199-204.

Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? ***Nature reviews***. ***Genetics,*** *5*(1): 63.

Schmidt, H., and Ketzel, A. 1993. *In vitro* culture techniques in sweet cherry breeding. In *II International Cherry Symposium,* 410 (pp. 111-114).

Scowcroft, W.R. and Larkin P.J. 1985. Somaclonal variation, cell selection and genotye improvement. P. 153-168. In: M. Murray (cd.). Comprenhensive biotechnology: the principles, applications ans regulations of biotechnology in industryi agriculture, and medicine. Permgamon, Oxford.

Singh, B.D. and Harvey B.L., 1975. Cytogenetic studies on *Haplopappus gracilis* cells cultured on agar and liquid medîa. ***Cytologia,*** 40: 347-354.

Siragusa, M., Carra, A,, Salvia, L., Puglia, A., De Pasquale, F., Carimi, F. 2007. Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. ***Plant Cell Rep.,*** 26: 1289–1296.

Shanjani, P.S., Mardi, M., Pazouki, L., Hagidimitriou, M., Avanzato, D., Pirseyedi, S.M., Nekoui, S.M.K. 2009. Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild *Pistacia* species using AFLPs. ***Tree genetics & genomes,*** *5*(3): 447-458.

Sharma, S., Bryan, G., Winfield, M., Millam, S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. ***Planta***, 226: 1449–1458.

Sharma, K. K. and Anjaiah, V. 2000. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (Arachis hypogaea L.) through Agrobacterium tumefaciens genetic transformation. ***Plant Sci.,*** 159: 7-19.

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

Shen, X., Chen, J., Kane, M., Henny, R. 2007. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 91: 21–27.

Shimamura, M., Yasue, H., Ohshima, K., Abe, H. 1997. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. ***Nature,*** *388*(6643): 666.

Skirvin, R.M., 1978. Natural and induced variation in tusse culture. ***Euphytica,*** 27: 241-266.

Skirvin, R.M., Mcpheeters, K.D., Norton, M., 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. ***Hortic. Sci.,*** 29 (11), 1232–1237.

Skoog, F. and Miller, S. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* sympsoc. ***Exp Biol.,*** 11: 118-40.

Slazak, B., Sliwinska, E., Saługa, M., Ronikier, M., Bujak, J., Słomka, A., Göransson, U., Kuta, E. 2015. Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 120:179–190.

Smith, D.R. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. ***Plant Tissue Culture and Biotechnology,*** 3: 63–73.

Smýkal, P., Horáček, J., Dostálová, R., Hýbl, M. 2008. Variety discrimination in pea (Pisum sativum L.) by molecular, biochemical and morphological markers. ***J Appl Genet.,*** 49: 155

Smýkal, P., Bacova-Kerteszova, N., Kalendar, R., Corander, J., Schulman, A. H., Pavelek, M. 2011. Genetic diversity of cultivated flax (Linum usitatissimum L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. ***Theoretical Applied and Genetics,*** 122 (7); 1385–1397.

Smulders, M., de Klerk, G. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. ***Plant Growth Regul.,*** 63: 137–146.

Sorkheh, K., Amirbankhtiar, N., Ercisli, S. 2017. Potential Start Codon Targeted (SCoT) and Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Wild *Pistacia* Species Population**.** ***Biochemical Genetics,*** Volume 54, Issue 4, pp: 368–387.

Stanišić, M., Raspor, M,. Ninković, S., Milošević, S., Ćalić, D., Bohanec, B., Trifunovića, M., Petrića, M., Subotić, A., Jevremović, S. 2015. Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture RAPD and flow cytometer analyses. ***S Afr J Bot.,*** 96: 42–52.

Stevens, P.F. 2008. Angiosperm Phylogeny.

Street, H.E. 1974. Tissue culture and palnt science 1974. Acad. Press, New York: 1-502.

Sun, S., Zhong, J., Li, S., Wang, X. 2013. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). ***Bot Stud.,*** 54(1): 36.

Suoniemi, A., Tanskanen, J., Schulman, A. H. 1998. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. ***The Plant Journal,*** *13*(5): 699-705.

Swartz, H.J., 1991. Post Culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (Eds.) Micropropagation, Techology and Application. ***Kluwer Academic publishers,*** Dordrecht, pp: 95-121.

Tanurdzic, M., Vaughn, M.W., Jiang, H., Lee, T.J., Slotkin, R.K., Sosinski, B., Thompson, W.F., Doerge, R.W., Martienssen, R.A. 2008. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. ***PLoS Biol.,*** 6(12): 2880–2895.

Teixeira da Silva, J.A., Nhut, D.T. 2003. Cells: functional units of TCLs. In: Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications. Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T (eds.).

Teixeira da Silva, J., Bolibok-Bragoszewska, H., Rakoczy-Trojanowska, M. 2007. Molecular Markers in Micropropagation. Tissue Culture and In Vitro Plant Research. ***Genes, Genomes and Genomics,*** 1. 66-72.

Tekin, H., Genç, Ç., Kuru, C., Akkök, F. 1990. Antepfıstığı Besin Kapsamlarının Belirlenmesi Ve En Uygun Yaprak Alım Zamanının Tespiti. 1. Antepfıstığı Sempozyumu. Gaziantep,, 1992. Doktora Tezi. Gaziantep Yöresinde Topraktan Ve Yapraktan Yapılan Farklı Gübre Uygulamalarının Antepfıstığının Yaprak Bileşimi, Gelişme, Verim Ve Ürün Kalitesine Etkisinin Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

Tekin, H., Arpacı, S., Atlı, S., Açar, İ., Yaman, A., Yükçeken Y., Karadağ, S. 2001. Antepfıstığı Yetiştiriciliği. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yayın No:13, 132 s.

Thieme, R., Griess, H. 2005. Somaclonal variation in tuber traits of potato. ***Potato Res.,*** 48:153–165.

Thorpe, T. A.; Harry, I.S.; Kumar, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh, P.; Zimmerman, R.H. eds. Micropropagation. Dordrecht, The Netherlands : ***Kluwer Academic Publishers,*** 311- 336.

Tican, A., 2008. Câmpeanu G, Chiru N, Ivanovici D. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. ***Rom Biotechnol Lett,.*** 13: 3791–3798.

Tilkat, E., 2003. *P. khinjuk* Stocks'un *in vitro* mikro çoğaltılması, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 77s.

Tilkat, E., Işıkalan, Ç., Onay A. 2005. İn vitro propagation of khinjuk pistachio (*Pistacia khinjuk* stocks) through seedling apical shoot tip culture. ***Propagation of Ornamental Plants,*** Vol. 5, no 3, 2005: 1-5.

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

Tilkat, E. Onay, A., Yıldırım, H. and Cetin Ozen, H. 2008. Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L., ***The Journal of Horticultural Science & Biotechnology***, 83(3): 328-333.

Tilkat, E. and Onay, A. 2009. Direct shoot organogenesis from in vitro derived mature leaf explants of pistachio, ***In Vitro Cellular and Developmental Biolog–Plant,*** 45:92-98.

Tilkat, E., Onay, A., Yildirim, H., Ayaz, E. 2009. Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. ***Sci. Hortic.,*** 121(3): 361-365.

Tilkat, E., Ozden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Onay, A., Ayaz, E. 2012. Novel Methods in Micropropagation of Pistachio, Crop Production for Agricultural Improvement (CPAI), Editors: Ashraf M., Öztürk M., Ahmad M.S.A., Aksoy A., ***Springer,*** pp: 379-393.

Tiwari, J.K., Chandel, P., Gupta, S., Gopal, J., Singh, B.P., Bhardwaj, V. 2013. Analysis of genetic stability of *in vitro* propagated potato .microtubers using DNA markers. ***Physiol Mol Biol Plants.,*** 19:587–595.

TOBB, 2014. Türkiye Tarım Sektörü Raporu. Erişim [https://www.tobb.org.tr/Documents/yayinlar/2014/turkiye tarim meclisi sektör raporu 2013 int.pdf]. Erişim tarihi: 10.12.2017.

Topcu, H., Nergiz, C. and Kafka, S, 2016. Novel microsatellite markers in *Pistacia vera* L. and their transferability across the genus *Pistacia*. ***Sci. Hortic.,*** 198: 91-97.

Turhan-Serttaş, P. 2016. Intraspecific variations in mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) studied by molecular markers. Yüksek lisans tezi, Abstract.

Turkeli, Y. and Kafkas, S. 2013. First linkage map in pistachio constructed using an interspecific cross between *Pistacia vera* L. and monoecious *Pistacia atlantica* Desf. ***Scientia Horticulturae,*** 151: 30-37.

Turner, S., Krauss, S. L., Bunn, E., Senaratna, T., Dixon, K., Tan, B. 2001. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. ***Plant Science,*** 161: 1099–1106.

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

TÜİK, 2016. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001]. Erişim tarihi: 12.12.2017.

TÜİK, 2017. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim [https://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf]. Erişim tarihi: 12.11.2017.

Türel, Ş. and Ayfer, M. 1959. Report to the Goverment of Cyprus on Improvement of Pistachio Nut Production, FAO Report No: 1015.

Ulusaraç, A. 1992. Antepfıstıklarına Anaç Seçimi, Ara Sonuç Raporu. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Gaziantep.

Uzun, A., Yeşiloğlu, T., Tuzcu, Ö. 2005. Seleksiyonla elde edilen Washington Navel Portakal tiplerinin adana koşullarında verim, kalite ve bazı vejetatif özelliklerinin belirlenmesi. ***Alatarım,*** 4(1): 1-12.

Uzun, A., Çoşkun, Ö.F., Yaman, M., Pınar, H., Paris, K. 2017. Identification of Genetic Similarities among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Selected from Central Anatolia Region of Turkey with SRAP Markers. ***Alatarım,*** 16 (1): 26-34.

Vannan, B.S. 2006. Analysis of generic relationships Anacardiaceae. ***Blumea,*** 51:165-195.

Vázquez, A.M. 2001. Insight into somaclonal variation. ***Plant Biosyst.,*** 135: 57–62.

Venkatachalam, L., Sreedkar, R.V., Bhagyalakshmi, **N.** 2007. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. ***Plant Growth Regulators,*** 51: 193-205.

Vezvaei, A. 1995. Isozyme diversity in some pistachio cultivars. First national workshop on pistachio nut (abstract book), Rafsanjan Pistachio Research Institute, Iran.

Virscek-Marn, M., Bohanec, B., Javornik, B. 1999. Adventitious shoot regeneration from apple leaves – optimization of the protocol and assessment of genetic variation among regenerants. ***Phyton,*** 39: 61-70.

Von Arnold, Alin. 1988. Gun. ***Plant Mol. Biol.,*** 17 : 259-63.

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

Vujović, T., Ružić, Đ., Cerović R., Momirović, G.Š. 2010. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus*L.) and assessment of genetic stability in regenerants. ***Plant Growth Regul.,*** 61: 265–275.

Vukich, M., Schulman, A.H., Giordani, T., Natali, L., et al. 2009. Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers. ***Theor. Appl. Genet.,*** 119: 1027-1038.

Wacksman, J.T. 1997. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. ***Mutation Res.,*** 375: 1–8.

Walter, C., Grace, L.C., Wagner, A., White., D.W.R., Walde., A.R., Donaldson, S.S., Hilton, H., Gardner, R.C., Smith, D.R. 1998. Stable transformation and generation of transgenic plants of Pinus radiata D.Don. ***Plant Cell Rep***. 17: 460–468.

Wang, H., Lian, Z., Lerch, M.M., Chen, Z., Xie, W., Ullrich, A. 1996. ***Oncogene,*** 12: 2555–2562.

Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, E.S. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. ***Science,*** 280: 1077–1082.

Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T., Powell, W. 1997. Genetic distribution of Bare–1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular and General Genetics *MGG***, *253*(6): 687-694.

Wessler, S.R., Bureau, T.E., White, S.E. 1995. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. ***Current opinion in genetics & development,*** *5*(6): 814-821.

Woodroof, J.G. 1979. Tree nuts, Production, Processing, Products. Vol. II. 2nd Edit. AVI, Westport, Connecticut.

Woodroof, J.C. 1982. Tree nuts: production, processing, porducts (seconded.). Wesport (CT): Avi Publishing Company Inc.

Xu, Y. 2010. Molecular plant breeding. CAB International.

Yakubov, B., Barazani, O., Golan, A. 2005. Combination of SCAR primers and Touchdown-PCR for sex identification in *Pistacia vera* L. ***Scientia Horticulturae,*** DOI: 10.1016/j.scienta.2004.06.008.

Yaltırık, F. 1967. *Pistacia* L. In: P.H. Davis (Ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. ***Edinburgh University Press,*** Edinburgh, Vol. 2, 544–549 pp. UK.

Yardımcı, B., 1973. Sert Kabuklu Fıstık (Antepfıstığı) (L. E. JOLEY'den Çeviri). Tarım Bakanlığı Ziraat Dışleri Genel Müd. Yay. 154, Ankara, 24 s.

Yang, Z.H. and Ludders, P. 1993. Effect of growth regulator and media on in vitro shoot tip culture different cultivars of mango (Mangifera indica L.) rootsctock. ***Acta Hort.,*** 341: 240-247.

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

Yusnita, Y., Widodo, W., Sudarsono, S. 2005. *In vitro* selection of peanut somatic embryos on medium containing culture filtrate of Sclerotium rolfsii and plantlet regeneration. ***Hayatı J Biosci.,*** 12(2): 50–56.

Zaloğlu, S., Doğan, Y. and Kafkas, S., 2009. Development of Microsatellite Markers in *P. vera* L. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds. Sanlıurfa, Turkey, October 6-10, Abstract Book, 82.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. ***Genomics,*** *20*(2): 176-183.

Zimmerman, R.H. and Deberg, P.C. 1991. Micropropagation: Techonology and Application. ***Kluwer Dordrecht***.

Zohary, M. 1952. A Monographical Study of the Genus Pistacia. ***Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series,*** 5: 187-228.

Zohary, M. 1972. *Pistacia* L. Flora Palestine. ***Isr Acad Sci and Hum.,*** 2: 297–300.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Diyarbakır'ın Bismil ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bismil'de tamamladım. 2006 yılında Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2011 yılında bölüm birinciliği ile mezun oldum. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans programı kapsamında halihazırda devam eden bir Tübitak projesinde bursiyer olarak dahil oldum ve 2013 yılında yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yılın eylül ayında D.Ü.F.B.E. Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Halen aynı bölümde eğitimime devam etmekteyim.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının amacı ilk defa ülkemizde doğal olarak yetişen *Pistacia* L. türlerinin kontrollü tozlaştırma ile elde edilen melezlerinin *in vitro* gelişme özelliklerinin belirlenmesi ve bunların klonal çoğaltım protokollerinin geliştirilmesi ve *in vitro* gelişen fidanların genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler kullanılarak belirlenmesidir. Çünkü Antepfıstığı, ülkemizin en önemli tarımsal ürünlerinden birisidir ve kolayca paraya çevrildiği için *Yeşil Altın olarak bilinir.* Dünyadaki en büyük antepfıstığı üreticisi olan ülkeler arasında Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır. Fidanlar tohum ile çoğaltıldığında genetik açılımdan dolayı tohumdan gelişen her fidanın verimliliğe etkisi farklı olacaktır. Bu nedenle antepfıstığı fidanlarının klonal olarak çoğaltılması gereklidir. Ancak, antepfıstığı heterozigotik yapısı nedeniyle doğal olarak dış döllenen bir bitkidir ve bu nedenle çelikleme ile çoğaltılması oldukça zordur. Ayrıca, doğal heterozigotik yapısından dolayı tohumdan gelişen her fidanın %50 erkek ve %50 dişi bitki olma olasılığı vardır (**Onay 1996**). Gerek antepfıstığı gerekse diğer ekonomik meyve türlerinde klonal fidan üretimi için olgun ağaçların cevap vermediği durumlarda, özellikle antepfıstığında doğal olarak tozlaştırılmış zigotik kökenli tohumların yerine kontrollü tozlaştırılmış melez tohumlardan klonal anaç üretimi yapılabilir (**Onay 1995; Onay 1996**). Klonal anaç kullanımının üretime etkisini miktar olarak daha az üretim alanından daha fazla üretim yapan iyi bir ABD örneği mevcuttur. 1970'li yıllarda ticari antepfıstığı bahçelerinin kurulduğu Amerika'da mevcut bahçelerdeki ağaçların anaçlarının %90'ı *P. atlantica* X *P. integerrima* hibriti yani UCB-I'dir. Keza, antepfıstığı üretiminde birinci durumdaki İran'da da bahçe tesisinde genellikle iki melez çeşit anaç olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kontrollü tozlaşma ile elde edilmiş 8 farklı tür içi ve türlerarası *Pistacia* genotiplerinden elde edilen melezlerin tohumlarından doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması iyi cevap veren 3 melez genotipin tek bir tohumdan itibaren klonal mikroçoğaltım protokolleri geliştirilmiştir. Ülkemizde melez genotiplerin yetiştiricilikte kullanım potansiyelinin ortaya konması konusunda çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu kapsamda bu çalışma ile melez genotiplerle bahçe tesisinin olmadığı ülkemizde, antepfıstığına anaç olabilecek melez genotiplerin *in vitro* yöntemlerle hızlı bir şekilde kısa sürede üretim protokolleri tanımlanarak klonal anaç yetiştiriciliği hakkında farkındalık oluşturulmasını umut

ediyoruz. Bugün itibariyle antepfıstığı yetiştiriciliğinde rekabet ettiğimiz özellikle Amerika'da ıslah programları ile geliştirilmiş çeşitler doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılarak yeni bahçeler tesis edilmektedir. Klonal fidanların kullanıldığı bahçelerin tesisi yapılmazsa önümüzdeki yıllarda şu anda üretim miktarı bakımdan üçüncü durumda olan yerimizi hızla üretim hacmini arttıran Çin ve jeopolitik stabilite sağlandıktan sonra Suriye gibi ülkelere kaptırabiliriz. Diğer üretici ülkelerle rekabet edebilmemiz için, büyük çapta ticari antepfıstığı bahçelerinin tesisi gereklidir.

Antepfıstığı bahçelerinin kurulumu amacıyla uygun çeşitlerin hızlı çoğaltımı için kullanılan geleneksel yöntemler talepleri karşılamada belirgin bir şekilde yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte; aşılama kalınlığına daha erken gelen, aşılandığı kültür çeşidi ile uyuşan, verimli, çıtlama oranı yüksek ve iri taneli meyve üretimine neden olan ve periyodisite eğilimi az olan ya da göstermeyen anaçlara ihtiyaç vardır. Bitki hücre, doku ve organ kültür teknikleri (organogenez, embriyogenez, mikroaşılama) geleneksel yöntemler ile çoğaltıma alternatif yaklaşımlar getirmektedir. Antepfıstığı ve anaçları üzerine çeşitli araştırmacılar tarafından bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen antepfıstığı anaçlarının ticari mikroçoğaltımı için laboratuvardan bahçeye bütünleşmiş bir çoğaltım yöntemi bugüne kadar rapor edilmemiştir. Bu nedenle, antepfıstığının çoğaltımı için geliştirilecek melez bitkilerin hızlı üretimi için güncel biyoteknolojik çoğaltım yöntemlerinin uygulanması bu tez çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

Bu kapsamda bu tez çalışmasında, klasik melezleme ile elde edilecek özellikle kök nematodlarına dayanıklı melez genotiplerin hızlı çoğaltımı için tüm mikroçoğaltım basamaklarının optimize edilerek, sürekli olarak kullanılabilecek bütünleşmiş çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca melezleme ile elde edilecek dört farklı türe ait erkek ve dişi anaç genotipler ile bu anaçların ikili melez kombinasyonları materyal olarak kullanılıp *in vitro* rejenere edilmiş klonal materyallerin genetik kararlılıkların moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Eksplant kaynağı (tohum, yaprak, anter, tomurcuk vs.) (**Ostry ve ark. 1994**), kültürün zamanı (**Scowcroft ve Larkin 1985**), kültür çeşidi (oganogenez, somatik embriyogenez gibi), besi ortamı içeriği (**Karp ve Bright 1985**; **Ostry ve ark. 1994)** ve kültür koşulları doku kültürü çalışmalarında varyasyonun olup olmamasında en önemli

faktörler olarak rol oynarlar (**Damasco ve ark. 1996; Skirvin ve ark. 1994**). Farklı moleküler belirteçlerin özelliği, belirteçler tarafından genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve germplazma kaynaklarının yönetiminde önemli bilgileri farklı seviyelerde sağlamasıdır.

İn vitro üretilen klonlarda genetik kararlılığı tespit etmek için çeşitli stratejiler izlenilmiştir. Mikroçoğaltım teknolojilerinin ticari varlığının sürdürebilmesi gerçeği göz önünde bulundurulduğunda rejenere olmuş bitkilerde genetik kararlılığın devamlılığına bağlıdır. Bu yüzden mikroçoğaltılmış bitkilerin detaylı değerlendirilmesi örneğin özellikle meyveye yatma periyodunun uzun olduğu çok yıllık bitki türleri gibi meyve türlerinde çok kritik hale gelir. Etkili ve hassas yeni moleküler uygulamalar somaklonal varyasyonu erken aşamada belirleyebilecek yeteneğe sahiptir. Bu araçlar varyantların hızlı tespiti ve doğru tanımlanması için çok faydalı olmuştur.

1980'den bu yana genom kimlik tespiti ve seçimi PCR teknolojisinin yardımıyla çok hızlı bir şekilde ilerledi. Yabani *Pistacia* türlerinde ve çeşitlerinde genetik çeşitlilik, parmak izi analizi, filogenetik ilişkiler, germplazm karekterizasyonu, cinsiyet belirleme ve genetik bağlantı haritalamaları gibi çalışmalarda kullanılmaya başlandı. Bunlar arasında RAPD *Pistacia* çeşitlerinin karekterizasyonunda yaygın olarak kullanıldı (**Kafkas ve Perl-Treves 2001**; **Kafkas ve ark. 2001; Williams ve ark. 1990; Hormaza ve ark. 1994a, 1998; Kafkas ve ark. 2002; Katsiotis ve ark. 2003; Golan-Goldhirsh ve ark. 2004; Mirzaei ve ark. 2005**). AFLP ve SSR teknikleri *Pistacia* tür ve çeşitleri arasında genetik ilişkileri belirlemede çeşitli çalışmalar yapıldı (**Golan-Goldhirsh ve ark. 2004; Katsiotis ve ark. 2003; Ibrahim-Basha ve ark. 2007; Ahmad ve ark. 2003; Ahmad ve ark. 2005; Ahmadi-Afzadi ve ark. 2007; Topcu ve ark. 2016; Alhajjar ve ark. 2016; Turkeli ve Kafkas 2013**). SRAP (**Ahmad ve ark. 2005**), SAMPL (**Karimi ve Kafkas 2011**), SNP (**Kafkas ve ark. 2015**), IRAP (**Ghaemmaghami ve ark. 2013; Kırdök 2016**), ISSR (**Noroozi ve ark. 2009**) gibi çeşitli moleküler belirteçler kullanılmaktadır. 1994'den bu yana yeni moleküler belirteç tekniği ISSR olarak adlandırılmaktadır (**Zietkiewicz ve ark. 1994**).

Moleküler belirteçler yüksek bitkilerin genomlarında tekrarlayan DNA dizileri çok daha fazla görüldüğünden dolayı, kapalı ve açık tohumlularda anne ve babadan gelen organel kalıtımının açığa çıkmasını sağlar ve somaklonal varyasyonu

değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır (**Ahuja 2001**). **Botstein ve ark.** (**1980**), farklı sürelerde *in vitro* çoğaltılmış *Pistacia* bitkicikleri için 0.25 - 0.5 arasındaki PIC değerlerinin orta derecede yani makul sınırda olduğunu bildirmişlerdir. **Akdemir ve ark.** (**2016**), uzun süre alt kültürlenmiş *Pistacia* klonlarında PIC değerlerini RAPD analizi ile 0.226, ISSR analizi ile 0.220 ve AFLP analizi ile 0.241 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile daha önce yapılan çalışmalar kıyaslandığında, makul oranda somaklonal varyasyon gözlenmiştir.

Klonal mikroçoğaltım, odunsu bitki türlerinde verimliliği ve homojeniteyi artırmak için etkili bir yöntemdir. Son yıllarda bitki mikroçoğaltım yöntemlerinin bahçecilik endüstrisine çok fazla katkısı olmuştur. Birçok bitkinin *in vitro* mikroçoğaltım başarısı ticarileşme için kullanılmaktadır. Dünya çapında bir çok ticari laboratuvar *in vitro* çoğaltım teknolojilerini kullanılmaktadır. Odunsu bitkilerin *in vitro* mikroçoğaltımı, seçkin genotiplerin daha hızlı çoğaltımı için geleneksel vejetatif çoğaltım sorunlarının üstesinden gelmek, hastalıksız bitkilerin üretimi ve hızlı çoğaltımı, genetik manipulasyonlar ve germplazm korunması gibi birçok avantaja sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda; melez genotiplerin morfolojik özellikleri, *in vitro* çimlenme kapasiteleri ortaya konulmuş, *in vitro* mikroçoğaltım yöntemleri belirlenmiş, mikroçoğaltım sonucu somaklonal varyasyonun olup olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında istenirse melez germplazmlarda genetik kayba uğramadan orta ve uzun süreli saklanabilecek ve standart anaçlardan daha iyi performans gösteren genotipler yeniden rejenere edilerek, yoğun fidan üretimi için kullanılabileceklerdir. Tüm bunların yanı sıra, çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ileride yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere anaç üretimi için olası genetik kararlılıklarının kısa ve orta süreli/düzeyde korunduğunu göstermesi açısından da önemlidir.

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	NAZAN ÇALAR
ÖĞRENCİ NO	13801503
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017 / 2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	BİYOLOJİ
PROGRAM	DOKTORA
TEZ KONUSU	MELEZ *Pistacia* L. GENOTİPLERİNİN KLONAL MİKROÇOĞALTIMI VE IRAP ISSR MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK KARARLILIKLARININ BELİRLENMESİ
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	295
BENZERLİK ORANI	%24
RAPORLAMA TARİHİ	10/04/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 295 sayfalık kısmına ilişkin, 10/04/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *.TURNİTİN* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 24 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)

NAZAN ÇALAR (**Öğrencinin Adı Soyadı**)

(İmza)
10/04/ 2018

Prof. Dr. AHMET ONAY
Tez Danışmanı

(İmza)
10/04/ 2018

Prof. Dr. HASAN ÇETİN ÖZEN
Anabilim Dalı Başkanı