

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
2012-YL-035**

**KESTANENİN (*Castanea sativa* Mill.) YARI-KATI VE SIVI
ORTAMLARDA MİKROÇOĞALTIMI**

Burak Erdem ALGÜL

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burak Erdem ALGÜL tarafından hazırlanan ‘Kestenenin (*Castanea sativa* Mill.)Yarı-Katı ve Sıvı Ortamlarda Mikroçoğaltımı’ başlıklı tez, 27.08.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ	ADÜ
Üye : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Engin ERTAN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.27/08/2012

Burak Erdem ALGÜL

ÖZET

KESTANENİN (*Castanea sativa* Mill.) YARI-KATI VE SIVI ORTAMLARDA MİKROÇOĞALTIMI

Burak Erdem ALGÜL

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ

2012, 50 sayfa

Bu çalışmada üç farklı kestane genotipinin GD+ MS ($1/2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$ ve KNO_3) ve MS ($1/2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$ ve KNO_3) yarı-katı ortamlarında mikroçoğaltımını karşılaştırmak hedeflenmiştir. Ayrıca yarı-katı ortamlara göre daha düşük işgücü maliyetlerine sahip sıvı ortamda (MS $1/2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$ ve KNO_3) çalkalama kültüründe kestane bitkisinin gelişme durumunu saptamak amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan kestane genotiplerini, Aydın ili Nazilli ilçesi kestaneliklerinde meyve kalite özelliklerine göre selekte edilmiş N-3-4 no'lu, N-23-1 no'lu ve N-7-3 no'lu genotipler oluşturmuştur. Denemede Ocak ayında GD ortamında kültüre alınan kestane tomurcukları 6 hafta sonra Mart ayında MS ($1/2$ Nitrat) ortamına aktararak 6 hafta süre ile gelişmeleri gözlenmiştir. Ayrıca Mart ayında araziden tekrar tomurcuklar alınarak MS ($1/2$ Nitrat) ortamına dikim yapılmış ve 6 hafta süre ile gelişmeler kaydedilmiştir. Denemede elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğine, MS ($1/2$ Nitrat) ortamında %41.48 oranında, GD+ MS ($1/2$ Nitrat) ortamında ise %25.51 oranında sürgün gelişimi elde edilmiştir. MS ($1/2$ Nitrat) ortamının en yüksek sürgün gelişimi ise N-23-1 genotipinde (%47.48) gözlemlenmiştir. En yüksek kabaran tomurcuk oranı ve en düşük kararma yüzdesi GD+ MS ($1/2$ Nitrat) besin ortamında, en yüksek ortalama yaprak sayısı MS ($1/2$ Nitrat) ortamında elde edilmiştir. Sıvı MS ($1/2$ Nitrat) ortamı içeren çalkalama kültüründe bitki eksplantlarında kararmalar oluşmuş ve gelişme gözlenmeden 3. haftada kayıplar yaşanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kestane, *Castanea sativa* Mill., yarı-katı ortam, sıvı ortam, mikroçoğaltım, GD ortamı, MS ortamı

ABSTRACT
MICROPROPAGATION OF CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)
IN SEMI-SOLID AND LIQUID CULTURE

Burak Erdem ALGÜL

M.Sc. Thesis, Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ

2012, 50 pages

In this study, micropropagation of three different chestnut genotypes have been compared in the GD+MS (1/2*NH₄NO₃ and KNO₃) and MS (1/2*NH₄NO₃ and KNO₃) semi-solid media. In addition to semi-solid media, their status of development has been observed in liquid medium (MS 1/2*NH₄NO₃ ve KNO₃) shake culture which having less workforce cost. Genotypes used in this study have been selected among the chestnut stands from Nazilli district of Aydın province. The genotype numbers are N-3-4, N-23-1 and N-7-3. During the experiments, chestnut buds cultured in January in GD medium have been transferred in to MS (1/2 Nitrate) medium after six weeks, in March. Their development in this culture has been observed for a period time of six weeks. Moreover, in March another set of buds have been directly planted into MS (1/2 Nitrate) medium and they were also observed for six weeks. From our results, it can be seen that the shoot formation level has reached to 41.48% for MS (1/2 nitrate) medium and 25.51% for GD+ MS (1/2 Nitrate) medium relatively. The highest value of development has been obtained with offshoots from the N-3-4 (37.21%) genotype for MS (1/2 nitrate) medium. In addition, while the highest value of bud out and browning percentage isobserved in the GD+ MS (1/2 Nitrate) medium, the number of avarage leaves is achieved in the MS (1/2 nitrate) medium.

When the results of liquid MS (1/2 Nitrate) are taken into consideration, it can be seen that a browning has been appeared on the explants. Some losses occurred already before the third week of cultivation.

Keywords: Chestnut, *Castanea sativa* Mill., semi-solid medium, liquid medium, micropropagation, GD medium, MS medium.

ÖNSÖZ

Ülkemizde kestane yetiştiriciliğinde Aydın ili birinci sıradadır. Aydın yöresi için büyük ekonomik öneme sahip kestane yetiştiriciliğinde en önemli sorunlardan bir tanesi standart çeşitlerin olmayışıdır. Her bölgede yöresel olarak yetiştiriciliği yapılan çeşit ve tipler bulunmaktadır. Bu durumda standart özelliklere sahip, kaliteli bir üretime engel olmaktadır. Üstün özellikte kestane genotiplerinin tespit edilip, üretime geçirilmesi ve yaygınlaştırılması meyvecilik adına büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada klasik üretim yöntemlerini tamamlayıcı olarak kullanılan doku kültürü teknikleriyle seçilmiş kestane genotiplerinin yarı-katı ve sıvı ortamlarda mikroçoğaltımı hedeflenmiştir.

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yönlendirici katkılarıyla her zaman destek olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ'a, bitki materyali temininde ve yazım aşamasında sürekli yardımda bulunan Yrd. Doç. Dr. Uğur ŞİRİN'e ve Doç. Dr. Engin ERTAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tüm çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan, sürekli destek olan ve varlığıyla mutlu olduğum sevgili nişanlım Özlem YÜRÜK'e ve canım aileme her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim. Ayrıca içten yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım Zir. Müh. Melih AYDINLI'ya, tezimi maddi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	10
2.1. Yarı-Katı Ortamda Kestane Mikroçoğaltımı İle İlgili Yapılmış Çalışmalar	10
2.2. Sıvı Ortamda Yapılmış Bazı Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM:.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kültür ortamları ve hazırlığı.....	22
3.2.2. Bitkisel materyalin hazırlığı ve dikim.....	24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1. 2011 Yılı Denemeleri.....	27
4.2. 2012 Yılı Denemeleri.....	28
4.2.1. Yarı-Katı GD ve MS ortamları.....	28
4.2.1.1. Tomurcuk Kabarması.....	28
4.2.1.2. Sürgün gelişmesi.....	30
4.2.1.3. Yaprak Sayısı.....	33
4.2.1.4. Kararma.....	35
4.2.2. Sıvı Kültür.....	37
5. SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER DİZİNİ

BA	Benzyladenin
BAP	Benzylaminopurin
BDM	Büyüme düzenleyici maddeleri
BW	½ Broad leaved tree medium- ½ Woody Plant Medium
CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
DKW	Driver and Kuniyuki
FAO	Food and Agriculture Organization
GA ₃	Giberellic acid
IAA	Indole Asetic Acid
IBA	Indole-3-Butyric Acid
LS	Linsmaier and Skoog
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
MS	Murashige and Skoog
NAA	Naphtalene Asetic Acid
Rpm	Rotation per minute
TIS	Temporary immersion system
WPM	Woody Plant Medium
TDZ	Thidiazuron
2-4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Mayıs 2011 tarihinde kültüre alınan N-3-4 genotipine ait boğumlarda dikimden 1 hafta sonra meydana gelen kararma	27
Şekil 4.2. GD+MS ve MS ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin kabaran tomurcuk yüzdeleri.....	29
Şekil 4.3. GD ortamında kültüre alınan N-3-4 genotipinde boğumların dikimi	30
Şekil 4.4. GD ortamında kültüre alınan N-3-4 genotipinde dikim sonrası kabarma	30
Şekil 4.5.GD+MS ve MS ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin sürgün gelişim yüzdeleri	32
Şekil 4.6. N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde sürgün oluşumu	32
Şekil 4.7. N-3-4 genotipinde çoğaltım yapılabilecek uzunluğa gelen sürgün	33
Şekil 4.8. GD+MS ve MS ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin ortalama yaprak sayıları	34
Şekil 4.9. N-7-3 genotipinde yaprak gelişimi.....	35
Şekil 4.10. GD+MS ve MS ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin kararma gösteren tomurcuk yüzdeleri.....	37
Şekil 4.11. Sıvı ortam çalkalama kültürü	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim miktarları (Anonymous, 2010).....	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de iller itibariyle kestane ağaç sayıları ve üretim miktarları (Anonim, 2003).....	3
Çizelge 3.1. MS ve GD ortamlarının içerikleri	23
Çizelge 4.1. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde kabaran tomurcuk oranları.....	29
Çizelge 4.2. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde gelişen sürgün oranları.....	31
Çizelge 4.3. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde elde edilen ortalama yaprak sayıları.....	34
Çizelge 4.4. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde kararın tomurcuk oranları.....	38

1. GİRİŞ

Fagales takımı içerisinde yer alan kestaneler (*Castanea* sp.), meşe (*Quercus* sp.) ve kayın (*Fagus* sp.)'larla birlikte *Fagaceae* (Kayıngiller) familyasına girmektedir (Soylu, 2004). Türkiye ve Dünya üzerinde kestanelerin bilinen 13 türü vardır ve genellikle kuzey yarımkürede; Asya, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'nın ılıman iklim türleri arasında yer alır (Soylu, 2004). Kestanelerin kültür bakımından önemli birkaç türü bulunmaktadır. Bu türler dünyanın farklı bölgelerinde meydana gelmiştir. *Castanea sativa* Mill. (Avrupa kestanesi), *Castanea dentata* (Marsh) Borkh. (Amerikan kestanesi), *Castanea crenata* Siebold & Zucc. (Japon kestanesi), *Castanea mollissima* Blume (Çin kestanesi) ekonomik değeri olan bazı kestane türlerindedir.

Kestanelerin dünyada ilk yayılış merkezinin neresi olduğu kesin olarak bilinmemekle beraber, eski Yunanlı ve Romalı yazarlara göre, M.Ö. 5. yüzyılda Anadolu'dan Yunanistan'a, buradan da Güney İtalya ve İspanya'ya götürüldüğü ifade edilmiştir (Erdem, 1951). Bazı yazarlar ise, kestanelerin ilk yayılış merkezinin Anadolu'da Kastanis (Kastamonu) şehri dolayında olduğu, cins ismine ait "*Castanea*" adını da buradan aldığı kanısındadırlar.

Kestane eskiden beri değerli bir ağaç olarak bilinmektedir. Kabukları, odunu, yaprağı ve kömürü değişik amaçlarla endüstride kullanılmaktadır. Ekonomik açıdan en önemli ürünü ise meyveleridir. Kestane üretim miktarımızın fazla olması ekonomik açıdan yarar sağladığı gibi, kestanelerin sosyal yapımızda da büyük önemi vardır. Çünkü kestanelikler çoğunlukla yüksek rakımlı, dik, orman karakterli alanlar olduğu için bu bölgelerde yaşayan halkın başlıca geçim kaynağını oluşturur (Delen, 1992).

Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkeler ile üretim alan (ha) ve miktarları (ton) dikkate alındığında; Çin, Kore, İtalya, Türkiye, Bolivya, Portekiz ve Japonya'nın en önemli üretici ülkeler olduğu görülmektedir.

2010 yılı rakamlarına göre, Dünya kestane üretiminin 1 milyon 620 bin tonu Çin tarafından karşılanmıştır. Türkiye ise 59 bin 171 ton kestane üretimi ile Dünya üretiminin %3,65'ini karşılamıştır (Çizelge 1.1). Bu bağlamda Türkiye'nin Dünya üretimindeki payı düşük gibi değerlendirilse de, bu pay yıllara göre değişmekte, üçüncü veya dördüncü sırada olacak şekilde gerçekleşmektedir. Kaldı ki, meyve özellikleri oldukça iyi olan Avrupa Kestaneleri (*Castanea sativa* Mill.) açısından

konu incelendiğinde; üretim miktarı açısından Türkiye, İtalya ve Portekiz'den daha fazla üretime sahiptir.

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim miktarları değişimi (FAO, 2010)

Üretim Miktarları (ton)					
Ülkeler	2006	2007	2008	2009	2010
Çin	1 139 660	1 266 510	1 450 450	1 550 000	1 620 000
Kore	82 450	77 524	75 171	75 911	82 200
İtalya	53 000	50 000	55 000	52 146	42 700
Türkiye	53 814	55 100	55 395	61 697	59 171
Bolivya	55 000	42 801	58 442	53 577	53 577
Portekiz	30 900	22 000	21 990	20 752	22 400
Japonya	23 100	22 100	25 300	21 700	23 500
TOPLAM (Dünya)	1 492 324	1 592 613	1 785 439	1 881 376	1 958 547

Çizelge 1.2. Türkiye’de iller itibariyle kestane ağaç sayıları ve üretim miktarları
(Anonim, 2003)

İLLER	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	Toplam Ağaç Sayısı (Adet)	Üretim Miktarı (ton)
Aydın	611.125	98.094	709.219	18.605
Kastamonu	164.145	12.169	176.314	9.225
İzmir	310.830	85.620	396.450	8.659
Sinop	153.300	25.250	178.550	4.504
Bartın	84.950	15.960	100.910	2.501
Kütahya	69.620	68.165	137.785	2.374
Manisa	55.850	4.650	60.500	2.050
Denizli	63.550	11.965	75.515	1.487
Bursa	46.200	3.020	49.220	1.455
TOPLAM (Türkiye)	1.920.235	393.760	2.313.995	59.171

Türkiye’de kestane üretiminin yapıldığı başlıca bölgeler; Ege, Karadeniz, ve Marmara bölgeleridir. Ülkemizde, Türkiye İstatistik Kurumu’nun 2009 yılı verilerine göre, 1 milyon 952 bin adet meyve veren yaşta ve 442 bin adet meyve vermeyen yaşta olmak üzere toplam 2 milyon 394 bin civarında kestane ağacı bulunmaktadır (Anonim, 2010).

Kestanenin Anadolu’ da çok eski zamanlardan beri kültürünün yapılması sebebiyle, bu uzun zaman süreci içerisinde meyve kalitesi ve ağaç özellikleri yönünden pek çok kestane tipi oluşmuştur (Soylu ve Ufuk, 1994). Nitekim günümüzde pazarda satılan kestanelerin tat, renk, irilik ve soyulabilirlik açısından büyük farklılıklar göstermesi de bunun en belirgin kanıtıdır. Anadolu’da 2,5 milyon dolayında olan kestane ağacı varlığı içerisinde çok fazla varyabilite mevcuttur. Bu zengin kaynak içinde verimli, renkleri çekici ve parlak, iri tiplerin yanında; küçük meyveli, verimsiz ve düşük kaliteli tipler de bulunmaktadır.

Doğada bulunan birbirinden farklı binlerce tip, ıslah açısından arzulan bir durumdur. Çünkü melezlemesi doğal olarak yapılmış ve farklı topraklara ve farklı iklimlere adapte olmuş hazır bir materyaldir. Bunların içerisinden üstün nitelikli olanları seçip vegetatif olarak çoğaltmak ıslahçılara kalmaktadır. İşte buradan hareketle, dünyada ıslahçılar bu doğal populasyondaki kestaneler üzerinde seleksiyon çalışmaları yapmışlar ve bugün yaygın olarak kullanılan standart çeşitleri elde etmişlerdir. Oysa ülkemizde bu şekilde kestane seleksiyon çalışmaları sınırlı kalmıştır. Bunun yanı sıra standart çeşitler elde edilememiş; çeşitler yerel çeşit olarak kalmaktan pek öteye gidememiştir (Ertan ve Kılınç, 2005).

Fagaceae familyasına ait meşe ve kayın gibi diğer bitki türlerinde olduğu gibi, kestane çoğaltımı oldukça zor olan bir bitki türüdür. Kestanenin en önemli üretim yöntemi, birçok problem barındırmasına karşın aşılama işlemidir. Aşılama işleminde yara yerlerinden kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica*) ve kestane mürekkep hastalığı (*Phytophthora cinnamoni*) gibi bir çok patojen giriş yapabilmekte ve anaç-kalem uyuşmazlıkları aşılama işlemini başarısız kılabilir (Osterc vd., 2001). Tüm bu olumsuzluklar kestanenin vegetatif olarak büyük ölçeklerde üretimine engel olmaktadır. Son yıllarda üstün özellikteki kestane genotiplerinin üretilmesinde klasik vegetatif üretim metodlarına alternatif olarak *in vitro* teknikler ile üretim aklı gelmektedir.

Biyoteknoloji kavramı içerisinde ele alınan *in vitro* teknikler, bitkilerde çoğaltım ve ıslah başta olmak üzere birçok konuda klasik yöntemlerle çözümü güç ya da olanaksız olan sorunlara karşı bazen tek başına ve bazen de klasik yöntemler ile birlikte kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler ile bitki genotipleri kontrollü koşullarda yoğun ve çok hızlı bir şekilde klonal olarak çoğaltılabilmekte, virüslerden arındırılabilen, gen kaynakları dar alanlarda uzun süreli muhafaza edilebilmekte, somatik embriyolar, homozigot hatlar, taksonomik sınırlama

olmaksızın farklı genetik kombinasyonlar elde edilebilmektedir. Ayrıca yaşama şansı düşük olan ya da bulunmayan zigotik embriyoların gelişimi ve çimlenmesi sağlanabilmekte, sekonder metabolitler üretilebilmekte, somaklonal varyasyonlar ve mutasyonlar ile genetik varyasyonlar yaratılabilmekte, stres koşullarına karşı genotiplerin dirençleri test edilebilmekte ve temel fizyolojik-biyolojik olayların seyri kontrollü olarak izlenebilmektedir (Sezgin ve Dumanlıoğlu, 2009).

Son yıllarda Dünya'da *in vitro* doku kültürü teknikleri alanında yaşanan gelişmeler, ticari öneme sahip birçok süs bitkisi, tıbbi bitki ve meyve türlerinin mikroçoğaltımına olanak sağlamıştır. Doku kültürü ile üretim dünyanın birçok ülkesinde yapılmakta ve yılda yaklaşık olarak 600 milyon bitki üretimi gerçekleştirilmektedir (Altman ve Loberant, 2000). Günümüzde kiraz, erik, şeftali ve armut gibi odunlu türlere ait meyvecilikte büyük öneme sahip klonal anaç üretimi *in vitro* şartlarda doku kültürü yöntemleri ile endüstriyel boyutta gerçekleştirilmektedir. Ayrıca *Anthurium*, *Spathiphyllum*, *Dahlia*, *Dieffenbachia*, *Ficus*, *Nephrolepis*, *Phalaenopsis*, *Saintpaulia*, *Philodendron* ve *Caladium* gibi süs bitkileri türlerinin ticari olarak mikroçoğaltımı yapılmaktadır.

Genellikle mikroçoğaltıma sürgün ucu ve bir göz taşıyan tekli boğumlar ile başlanılmaktadır. Sürgün uçlarının sürmesi sonucu oluşan uzun sürgünlerden göz içeren boğumların, tekrar kültüre alınması yoluyla (tek boğum kültürü) ya da sürgün uçlarının, yaprak koltuklarında bulunan uyur gözlerin, sitokinin uygulamalarıyla sürdürülmesi sonucu yan dalların oluşturulması yoluyla çoğaltma sağlanabilmektedir (Rowe, 1986; Zimmerman, 1991). Bu iki metot ayrı ayrı uygulanabildiği gibi, birlikte de kullanılabilir ve böylece üretim hızı arttırılabilmektedir.

In vitro vegetatif üretimin başlangıç aşamasında, eksplant alınacak bitkilerin seçilerek, bakımlarının gerçekleştirilmesi gereklidir. İyi gelişen, sağlıklı bitkilerle kültüre başlanması, başarı şansını arttırarak, temiz kültür elde edilmesini kolaylaştırmaktadır. Daha sonraki aşamada, meristem, tomurcuk veya sürgün ucu gibi eksplantların steril olarak izolasyonu gerçekleştirilir. Bir sonraki aşama ise, eksplantın regenerasyon kabiliyetini kaybetmeden çoğaltılmanın gerçekleştiği sürdürme aşamasıdır (Hepaksoy, 2004).

Aydın yöresi için stratejik öneme sahip olan kestane ağaçlarının bir bölümü tohumdan oluştuğu için standart bir üretim yapılamamaktadır. Bu nedenle yeni kestane plantasyonlarının oluşturulmasında, vegetatif yollarla (aşı, *in vitro* kültür teknikleri) çoğaltma işlemi yapılmalıdır. Kestane yetiştiriciliğinde aşılama, çeliklerin köklendirilmesi ve daldırma gibi çeşitli vegetatif çoğaltım yöntemleri kullanılabilmesine rağmen, bu yöntemler her zaman seri bir çoğaltım için yeterli olmamaktadır. Artık günümüzde yapılan çalışmalar meyve türlerinin üretiminde alternatif bir yöntem olarak doku kültürü üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır.

Kestenenin mikroçoğaltımı için yıllardır Murashige ve Skoog (1962) (MS), Gresshoff Doy (1972) (GD), Woody Plant Medium (1980) (WPM), ve Heller's medium (1953) (HM), gibi çeşitli kültür ortamları denenmektedir. Bir çok araştırma sonunda GD ve yarı nitrat konsantrasyonlu MS temel besin ortamlarının Avrupa kestanelerinin genç ve yaşlı materyal kullanımı için uygun olduğu tespit edilmiştir. GD ve MS ortamlarının kullanımıyla sürgün ucu ölümü ve sararma oranları diğer besin ortamlarına göre daha düşük olarak saptanmıştır. (Veitez vd., 1986; Sanchez vd., 1997; Gonçalvez vd., 1998; Ballaster vd., 2001).

Kestanelerin mikroçoğaltımda yan tomurcuklar ve meristemlerin kullanımının başarılı sonuçlar verdiği ve ana bitkinin yaşına ve kültüre alma zamanına bağlı olarak, başarılı kültür başlatma oranlarının % 0–90 arasında değişerek büyük farklılıklar meydana getirdiği bildirilmektedir (Chauvin ve Salesses, 1988). Mikroçoğaltımda kestane üretim materyelinin gelişerek salkım oluşturabilme durumu araştırıldığında, başarılı bir çoğaltım için düşük oranda N ve NH_4NO_3 oranları önerilmiştir (Piagnani ve Eccher, 1988). *Castanea sativa* X *Castanea crenata* melez grubuna ait farklı kestane klonlarının farklı ortamlarda sürgün salkımı oluşturabilme oranları karşılaştırıldığında, Heller (1953) ve düşük konsantrasyonlu NH_4NO_3 içeren MS ortamında en çok sayıda sürgün elde edilmiş, sürgün uzunluğuna bakıldığında ise, yarı NO_3 konsantrasyonlu MS ortamı ve Lepoivre ortamında en yüksek sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Farklı sitokinlerin yan sürgün gelişimi üzerinde etkileri araştırıldığında ise, BAP'ın (6-benzylaminopurine) sürgün gelişimini teşvik etmede en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir (Veitez ve Veitez, 1980). Kestane mikroçoğaltımında genç ve yaşlı bitkilerinden alınan eksplantlar kullanılabilmesine rağmen, genel olarak genç bitkilerden yapılan mikroçoğaltım daha başarılı olmaktadır (Veitez vd., 1986).

Kestane mikroçoğaltımında sürgün elde edilme işlemi başarılı bir şekilde yapılabilmesine rağmen, düşük oranlarda köklenme gerçekleşmektedir (Yang vd., 1999). Düşük köklenme yüzdesi ve çoğaltılan sürgünlerde görülen uç kuruması, doku kültürü teknikleri kullanarak kestane üretimini sınırlayan en önemli iki faktördür (Xing vd., 1997).

Doku kültürü teknikleri kullanılarak yapılan mikroçoğaltımda genel olarak katılaştırıcı agar kullanılmasıyla katı kültür uygulanmaktadır. Klasik doku kültürü teknikleri yoğun işgücüne ve yüksek üretim maliyetlerine sahiptir. Her bir üretim materyali yaklaşık 0.10–0.15 US\$ maliyete sahiptir. Toplam üretim maliyetinin %50-85'ini yoğun işgücü maliyetleri oluşturmaktadır (Dey, 2005). Eğitimli ve tecrübeli bir işçi dahi bir günde en fazla 1000 dikim yapabilmektedir. Klasik katı kültür yönteminin kullanılmasıyla çok sayıda kültür kabına gereksinim duyulmakta ve bu durum da geniş aydınlatma alanlarının bulunmasını zorunlu hale getirmektedir. Tüm bu olumsuz şartlar doku kültürleri aracılığıyla üretimin endüstriyel boyutta gelişmesine engel olmaktadır (Takayama ve Misawa, 1981). Son yıllarda üretim maliyetleri düşük, kısa zamanda büyük ölçekte üretimin yapılabilmesi, etkili üretim şekilleri arayışı doğmuştur. Bu amaçla, uygun protokollerin kurulması halinde, katı kültürden daha etkili üretim olanakları taşıyan sıvı kültürlerin kullanılması gündeme gelmiştir. Sıvı kültürlerin kullanılması ile yüksek hacimde çalışma imkanı sağlanır. Kültür atmosferinin yenilenmesini sağlar. İnokulasyon ve hasat gibi uygulamaların kolay olması ile işgücü maliyeti dengede tutulur. Apikal dominansın ortadan kalkmasıyla çoğaltım katsayısı artar. Çok sayıda bitkicik büyük ölçekte çoğaltılabilir. Eksplantların sıvı kültürde ortamla devamlı temas halinde olmasından dolayı besin maddesi alımı kolaylaşır ve gelişme oranı artar. Besleyici bir madde olmamasına rağmen ortamdaki en maliyetli bileşen olan katılaştırıcı agarın kullanılmaması ile maliyet düşer (Takayama ve Akita, 2005).

Günümüzde sıvı kültür çalışmalarında akla ilk gelen üretim şekli biyoreaktörler ile yapılan kitlesel çoğaltım şeklindedir. Biyoreaktör teknolojisinin, etkili ve hızlı klonal bitki çoğaltımında kullanımı gelecek vaad etmektedir. Biyoreaktörler; katı, yarı katı ortamlı klasik doku kültürü teknolojisi ile karşılaştırıldığında işgücü, maliyet ve yerden tasarruf sağlamaktadır. Hücre, doku, somatik embriyo ya da organogenik yapıların sıvı ortamda kitlesel üretimine olanak vermektedir. Büyük ölçekli sıvı kültürler, organogenesis ya da somatik embriyogenesis yollarıyla mikro çoğaltım için kullanılmaktadır. Biyoreaktörler, otomasyon imkanları ile propagüllerin

yüksek verimde ve kalitede üretimini olabildiğince düşük maliyetli olarak gerçekleştirebilirler.

Biyoreaktörler; sıvı ortamda bitki dokusu ve hücrelerin gelişimi için gerekli; sıcaklık, pH, oksijen, besin maddesi gibi fiziksel ve kimyasal parametreleri düzenleyerek, optimum gelişme koşullarını sağlayan cihazlardır (Celiktaş vd., 2010).

Biyoreaktörlerin 1981 tarihinden bu yana birçok bitki türü ve bitki organları için (sürgün, soğan, yumru, soğanımsı gövde (corms) ve somatik embriyolar) uygulanabilir olduğu ispatlanmıştır. Son yıllarda, biyoreaktörlerin avantajları, çeşitli dizayn tipleri ve uygulama stratejileri üzerinde çeşitli yayınlar yapılmaktadır (Ziv, 2000; Takayama ve Akita, 2005; Preil, 2005; Takayama ve Akita, 2008).

Bitkilerin biyoreaktörde üretimi için, ilk olarak bitkiler sıvı ortamda kültüre alınmalıdır. Birçok bitkinin sıvı ortamda gelişimi sınırlıdır. Bu gerçeğe rağmen sıvı kültürde havalandırma işleminin gerçekleştirilmesiyle çoğu bitkinin gelişimi teşvik edilebilmektedir. Sıvı ortamda monokotiledon ve otsu kapalı tohumlu bitkiler iyi gelişme gösterirken, özellikle açık tohumlu odunsu türlerin gelişimi zordur. Sıvı ortamda gelişen bitkiciklerin yaprakları ve gövdeleri vitrifikasyon (camsılaşma) gösterme eğilimindedir. Vitrifikasyon zararının kültür ortamlarında tuz ve şeker konsantrasyonlarının azaltılması ve ışığın artırılmasıyla kısmen önüne geçilebilmektedir. Sıvı ortamda gelişen bitki eksplantları; ortam içeriği, ışıklandırma ve sıcaklık gibi kültür koşullarından etkilenmektedir. Sıvı ortamda başarılı bir üretim için morfolojik ve fizyolojik koşulların düzenlenmesi gerekmektedir (Takayama ve Akita, 2005).

Biyoreaktörlerde kitlesel bitki üretim protokollerinin kurulabilmesi için, katı kültür ve sıvı ortamda çalkalama kültürü kullanarak kültür koşulları dikkatli bir şekilde gözden geçirilmelidir. Çalkalama kültürü bitki türlerinin biyoreaktörde kültürasyonuna uygunluğunu tespit edebilmek için kullanılabilir. Çalkalama kültüründe başarıyla gelişebilen bitki türlerinin sıvı ortamda biyoreaktörde büyük ölçekte üretimi yapılabilir. Çalkalama kültürü katı kültürle karşılaştırıldığında oldukça kolaydır ve daha düşük işgücü gerektirmektedir. Bu tip avantajlar çalkalama kültürünü etkili bir bitki kitlesel üretimi için uygun hale getirmektedir. Çalkalama kültürü katı kültür ile

biyorekatör kültürü arasında bir geçiş aşamasıdır. Biyoreaktörde kitlesel bitki üretimini etkinliği katı kültür ve çalkalama kültürüne kıyasla oldukça yüksektir ve yaklaşık 1/12.5 oranında işgücü maliyetini düşürmektedir (Takayama ve Akita, 2005).

Bitki mikroçoğaltımında klasik doku kültür metotlarının kullanılmasından kaynaklanan yoğun işgücü ve yüksek maliyet, endüstriyel boyutta bitki mikroçoğaltımının gelişimine engel olmaktadır. Bu çalışmada, üretim maliyetleri düşük, kısa zamanda büyük ölçekte üretimin yapılabileceği sıvı kültürlerin kullanımını hedeflemek adına kestanenin klasik yarı-katı kültür metoduyla çoğaltımı ile çalkalayıcı (shaker) kullanılarak sıvı kültürde çoğaltımı karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Yarı-Katı Ortamda Kestane Mikroçoğaltımı İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Yapılan araştırmalarda yıllar boyunca kestanenin mikroçoğaltımı için farklı temel besin ortamları (MS, modifiye MS, GD, DKW, Heller, WPM) ve başlangıç eksplantları kullanılmıştır (Veitez vd., 1986; Sanchez vd., 1997; Gonçalvez vd., 1998; Ballaster vd., 2001). Çalışmalar sonucunda kestanenin düşük nitrat konsantrasyonlu MS ortamı ile GD ortamlarında daha iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir (Vieitez vd., 2007).

Mert ve Soylu (2009)'nun yaptıkları araştırmada, MS (1/2XNH₄NO₃ ve KNO₃) ve DKW (Driver- Kuniyuki Walnut medium) ortamlarında sürgün elde etmek için başlangıç eksplantı olarak dormant tomurcukları kullanmışlardır. Kültür başlatma, çoğaltma ve köklendirme şeklinde üç aşamadan oluşan çalışmada, başlangıç ortamında 0.1 mg/L gibberelik asit (GA₃) + 0.1 mg/L IBA, 0.5 ve 1 mg/L olmak üzere iki konsantrasyonlu 6-benzyl-aminopurine (BAP) kullanılmıştır. Çoğaltma ortamında, 2007 yılında 0.5, 1, 1,5 mg/L BAP, 2008 yılında ise sadece 1 mg/L BAP içerikli MS (1/2 Nitrat) ortamı içeren, köklendirme aşamasında ise 2007 yılında 1 mg/L IBA, 2008 yılında 2 mg/L IBA olmak üzere MS (1/2XNH₄NO₃ ve KNO₃) ortamı kullanılmıştır. Sürgün oluşturma oranlarına bakıldığında 1 mg/L BAP içeren MS(1/2 Nitrat) ortamının en iyi sonuç verdiği görülmüştür. MS (1/2 Nitrat) ortamında DKW ortamına kıyasla sürgün gelişimi döneminde vitrifikasyon ve kahverengileşme daha düşük oranda olmuştur. Araştırmada sürgünlerde kallus oluşumu gözlenmesine karşın köklenmenin gerçekleşmediği belirtilmiştir.

Diğer bir çalışmada bazı kestane hibritlerinde, yerel çeşitlerinde ve tiplerinde MS, modifiye MS ve WPM temel ortamları kullanılarak sürgün ucu ve yan tomurcuk kültürü aracılığıyla mikroçoğaltım olanakları araştırılmıştır. Çalışmada bazı ortamlara BAP, IBA ve thidiazuron ilavesi yapılmıştır. Sonuç olarak yıllar arasında değişmekle birlikte yan tomurcuk kültürünün başarılı sonuç verdiği buna karşın sürgün ucu kültüründen sonuç alınmadığı tespit edilmiştir. Özellikle serada yetişen 1, 2 ve 3 yaşlı çöğürlerden alınan tomurcukların daha iyi gelişme gösterdiği belirtilmiştir. Genel olarak farklı dönemlerinde araziden alınan 5-7 yaşlarında ağaçların yan tomurcuklarının iyi gelişme göstermediği görülmüştür.

Çalışmada eksplant kaynağı bitkinin genç yaşta olmasının kestane mikroçoğaltımında en önemli faktör olduğu belirtilmiştir (Soylu ve Ertürk 1998)

MS ½ Nitrat ortamının kullanıldığı farklı bir çalışmada, kestane sürgünlerinin *in vitro* şartlarda farklı besin ortamlarında mikroçoğaltımı yapılmıştır. Çalışmada MS ½ Nitrat ve BW besin ortamlarının mikroçoğaltım etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak sürgün kalitesi bakımından MS ortamı BW ortamına kıyasla daha iyi sonuç verdiği belirtilmiş ve çoğaltım için uygun sürgün oranı MS ortamında % 86, BW ortamında ise % 71.25 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Osterc vd., 2005).

Piagnani ve Eccher (1988) ise modifiye MS ortamında farklı N ve NH₄ seviyelerinin gelişen sürgünler üzerinde etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda en yüksek çoğalma oranı ve en düşük vitrifikasyon oranının düşük N ve NH₄/NO₃ içeren ortamda gerçekleştiği belirtilmiştir. Çoğalma ve köklenme, 3 farklı kestane klonunun embriyolarından gelişen sürgünlerde yan tomurcuklardan gelişen sürgünlere kıyasla daha yüksek olmuştur.

MS besin ortamı ile Heller besin ortamının sürgün oluşumu üzerinde etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışma sonucu olarak; MS ortamında çoğaltım yapılması sonucu vitrifiye olmuş sürgünler elde edilirken, 1 µM (NH₄)₂ SO₄ içeren ya da içermeyen Heller besin ortamının kullanılmasıyla normal sürgünler elde edildiği bildirilmiştir (Vieitez vd., 2006).

Kestanenin Heller besi ortamında mikroçoğaltımına örnek olabilecek başka bir çalışmada ise Avrupa kestanesinin düşük mineral madde içerikli ortamlarda kök, hipokotil ve epikotil segmentleri kullanarak mikroçoğaltım gerçekleştirmiştir. En yüksek tomurcuk farklılaşması 2 mg/L BA + 0.01 mg/L NAA ya da IBA uygulamasında meydana gelmiştir. Adventif tomurcuklara 0.1 mg/L BA etkili olmuştur. Köklenme için IBA uygulamasının gerekli olduğu belirlenmiştir (San Jose vd., 1984).

Temel besin ortamı olarak GD besin ortamı kullanılmasının başarılı sonuçlar verebileceğine ilişkin örnekler bulunmaktadır. Sanchez ve Vieitez (1991) beş olgun kestane klonunun (*Castanea sativa* Mill. ve *C. sativa* x *C. crenata* Siebold & Zucc.) bazal sürgünleri ve taç sürgünlerinin GD ortamında *in vitro* şartlara uygunluk kapasitelerini karşılaştırmıştır. Sürgün geliştiren eksplant oranı, eksplant başına ortalama sürgün sayısı, her kültürün en yüksek sürgün uzunluğu ve

çoğaltım katsayısı baz alındığında aynı ağaçtan alınan bazal sürgünlerin taç sürgünlerine kıyasla daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip oldukları belirtilmiştir.

Farklı bir çalışmada ise, GD temel besin ortamı (başlangıç aşamasında 0.5 mg/L BA, 30 g/L sakkaroz ve 7 g/L agar; sürgün çoğaltımında 0.2 mg/L BA) kullanarak kestane hibritlerinde sürgün ucu ve boğum eksplantlarının mikroçoğaltımını gerçekleştirmiştir. Köklendirme için 2 uygulama yapılmış; 1/3 konsantrasyonlu GD ortamına 3 mg/l IBA (ilk 5 günü karanlıkta olmak üzere 7 gün) ya da 25-50 mg/L IBA içeren ortamda 24 saat süreyle kültüre alınmıştır. Çalışmada köklenme (%17.6-96.4) için 25-50 mg/L IBA içeren ortamda 24 saat süreyle kültüre alma uygulaması ve bazı klonlarda %1 aktif kömür ilavesi önerilmiştir (Sanchez vd., 1997).

Çoğaltım ortamı olarak GD, MS, HM, LP, B1, SH ortamları kullanılan ve farklı mineral ortam ve karbon kaynaklarının *Castanea sativa* x *C. Crenata* melezlerinde çoğalma kapasiteleri üzerine etkileri araştırılan bir çalışmada, çeşitler arası gelişme farklılıkları görülmesine karşın en uygun çoğaltım ortamının GD ve MS (1/2XNH₄NO₃ ve KNO₃) ortamları olduğu belirtilmiştir. Karbon kaynağı olarak sukroz, glukoz, fruktoz ve sorbitol kullanılmıştır. Ana karbon kaynağı olarak sorbitol kullanımının tüm çeşitlerde çoğalma oranlarını önemli derecede düşürdüğü ve diğer karbon kaynaklarının çeşitler arasında sürgün çoğalması üzerine farklı etkiler yaptığı bildirilmiştir (Ballaster vd., 2001).

Kestanenin *in vitro* şartlarda üretimini engelleyen etkenlerden biri de yoğun fenolik madde salgısıdır. Chauvin ve Salesses (1988), uygun çoğaltım materyalini belirlemek ve fenolik madde salgısının olumsuz etkilerini azaltabilmek için meristem ve yan tomurukları kullanarak mikroçoğaltım gerçekleştirmiştir. Çalışmada: genotip, eksplantların alınma tarihi ve ana bitkinin durumu tomurukların gelişme oranını belirleyici rol üstlenmiştir. Meristemlerden sürgün oluşumu sadece BAP, IBA ve GA₃ içeren ortamda meydana gelmiştir. Ortama askorbik asit ilave edilmesiyle fenolik madde salgısının olumsuz etkisinin kısmen önüne geçildiği belirtilmiştir. Oluşan sürgünlerin dip kısmına oksin solusyonu muamelesi ile köklenme elde edilmiş ve dış koşullara adaptasyonun başarı ile yapıldığı belirtilmiştir.

Kestane mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmalar incelendiğinde tomurcuk, boğum ve sürgün ucu kültürlerinin yanında tohumdan sürgün elde edilmesi şeklinde yürütülen çalışmalara da rastlanılmaktadır. Buna örnek olabilecek bir çalışmada Japon kestanesinde (*Castanea crenata* Sieb. Et Zucc) rejenere organ kültürü yoluyla, tohumlardan mikro çoğaltım yolu araştırılmıştır. *İn vitro* şartlarda tohumdan sürgün çoğaltımı için sadece sitokinin kullanılan çalışmada, kinetin ve 2-İp kullanımının sürgün oluşturmada başarısız olduğu, ancak yüksek konsantrasyonlarda (25–50 µM) BAP kullanımıyla tohumdan çoklu sürgünler elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada tek sürgünden çoklu sürgün üretimi için sitokinin ve oksin kombinasyonu (0.5 µM BAP ve IBA 0.025 µM) kullanılmıştır. Her dört haftada bir sürgünlerin ¾'ü kesilerek taze ortama dikilmiş ve yeni çoklu sürgünler elde edilmiştir. Bu teknikle bir yılda tek bir sürgünden yaklaşık olarak 1.600,000 sürgün elde edilebileceği belirtilmiştir (Hisajima vd., 1989).

Kestane köklenmesi oldukça zor olan bir bitki türüdür (Vieitez vd., 2007). Yıllar boyunca araştırmacılar çeşitli yöntemlerle ve farklı besin ortamlarında kestane köklenmesine ilişkin çalışmalar gerçekleştirmiştir. Köklenme ile ilgili çalışmalara örnek olarak Tetsumura ve Yamashita (2004) Japon kestanesinde (*C.crenata*) farklı temel besin ortamlarını kullanarak boğum kültürü gerçekleştirmiştir. Farklı besin ortamları, büyümeyi düzenleyiciler ve uygulamaların boğum kültürlerinde sürgün oluşumu, gelişimi ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir. DKW ortamında vitrifikasyon sorunu belirlenmiştir. Köklenme, 15µM IBA ilave edilmiş ½ konsantrasyonundaki BW ortamında 5 gün uyarımdan sonra vermikulit ilave edilmiş yarı katı ½ BW ortamında daha iyi sağlanmıştır. Sato'nun BW ortamı ½NO₃'lı MS ortamıyla aynı etkiyi göstermiş ve 5µM zeatinin aynı dozda BA ve TDZ'den daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca köklenen bitkilerin dış koşullarda daha kuvvetli geliştiği belirtilmiştir.

Woody Plant ortamında Amerikan kestanesinin (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.) mikro çeliklerinin köklendirmesi gerçekleştirilen başka bir çalışmada üç aşamalı köklendirme uygulaması yapılmıştır. İlk olarak başlangıç sürgünleri 2-3 cm uzunluğuna ulaşıncaya kadar 4-8 hafta süreliğine 0.89 µM BA içeren Woody Plant ortamında tutulmuştur. Daha sonra sürgünler dikey olarak 2 mm uzunluğunda yarılarak 1 dk süre ile 5-10 µM IBA solusyonuna daldırılmış ve 2 hafta süre ile yarı konsantrasyonlu MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu aşamada köklenmesi gerçekleşen sürgünler 3 hafta süre ile sürgün uzama ortamına aktarılmıştır.

Çalışmada sonuç olarak kullanılan sürgünlerin %57 ile %73'ü köklenme göstermiştir. Ayrıca köklenen sürgünlerin %27'den azında sürgün ucu kurumması görüldüğü bildirilmiştir (Xing vd., 1997).

WPM ortamında farklı konsantrasyonlardaki büyüme düzenleyicilerinin (oksin ve sitokinin) Amerikan kestanelerinde (*Castanea dentata*) *in vitro* sürgün çoğalması, kallus oluşumu ve köklenme üzerine etkilerini araştırıldığı diğer bir çalışmada ise oksin grubundan IBA, NAA, 2,4 D, ve 2,4,5-T, sitokinin grubundan ise kinetin, TDZ, CCPU ve zeatin kullanılmıştır. Sonuç olarak WPM besin ortamında düşük konsantrasyonlu CPPU VE TDZ kullanımında diğer sitokininlere göre daha yüksek oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Oksin uygulamalarında ise; 2,4-D, 2,4,5-T' nin kallus oluşumunda etkili olduğu, 2,4-D, 2,4,5-T ve NAA uygulamalarının ise köklenmeyi başlattığı tespit edilmiştir (Yang vd., 2009)

Yine WPM besin ortamı kullanılarak IBA, Sukroz ve temel ortam konsantrasyonlarının Amerikan kestanesinin (*Castanea dentata* (Marsh)) köklenme performansı üzerine etkileri araştırılan bir çalışmada iki aşamalı köklendirme yöntemi izlenmiştir. Çalışmada kısa süreli oksin (IBA) muamelesini oksin bulunmayan ortama transfer takip etmiştir. Araştırmada sürgün başına gelişen kök sayısı ele alındığında yarı konsantrasyonlu WPM ortamında, %4'lük (w/v) sukroz konsantrasyonunda ve 369 µM IBA konsantrasyonlarında en iyi sonucun alındığı belirtilmiştir (Serres vd., 1990).

WPM besin ortamı kullanılarak yürütülen farklı bir çalışmada ise Avrupa kestanesi sürgün ucu ve boğumları (başlangıçta 1.0 mg/L BA+0.01 mg/L IBA, sürgün çoğaltmada 0.1 mg/L BA) kültüre alınmıştır. Köklendirme için mikro çelikler 3 mg/L IBA ilave edilmiş makro element düzeyi 1/3 konsantrasyonunda olan temel besin ortamı üzerinde 5 gün süreyle karanlık koşullarda ve daha sonra oksin içermeyen besin ortamının katıldığı steril perlitte tutulmuştur. Çalışma sonucu olarak genç bitkilerden kaynağını alan *in vitro* sürgünlerde köklenme başarısının %65.5, bitkileri dış koşullara başarı ile alıştırma oranının ise %40 olarak elde edildiği belirtilmiştir (Giovannelli ve Giannini 1999).

Gonçalves vd. (1998) kestanede (*Castanea sativa* X *C.crenata*) bitki canlılığını arttırmak ve köklenme sürecini daha iyi anlayabilmek için farklı köklendirme uygulamalarını karşılaştırmıştır. Köklenmeyi başlatmak için sürgünlerin dip kısmı 1 dk süre ile 1 g/ L IBA solusyonuna batırılmış ya da 5 gün süre ile 3 mg/l IBA

agar ortamına yerleştirilmiştir. Kök gelişimi için bu sürgünler oksin bulunmayan agar ortamına (*in vitro* köklendirme) ya da torf-perlit ortamına (*ex vitro* köklendirme) dikilmiştir. Köklenen sürgünlerin dış ortama adaptasyonu sağlanmıştır. IBA solusyonuna daldırma işleminden sonra köklenme yüzdesi *in vitro* şartlarda %97, *ex vitro* şartlarda %77 olarak tespit edilmiştir. IBA'lı agar ortamından sonra ise kök gelişme koşullarının köklenme yüzdesini etkilemediği bildirilmiştir (*in vitro* köklenme %93, *ex vitro* köklenme %87). Dış koşullara adaptasyon döneminde *ex vitro* şartlarda kök geliştiren bitkiciklerin %100'ü sağlıklı geliştiği, *in vitro*'da gelişen bitkiciklerin ise sadece %50'sinin hayatta kaldığı belirtilmiştir.

Nas vd. (2003) Nas ve Read ortamlarında American kestanesi, hibrid fındık ve asmanın *in vitro* kültürlerini gerçekleştirmiştir. Mikroçoğaltımı yapılmış sürgünler (2-4 cm), yine *in vitro* şartlarda çoğaltılan köklenmemiş anaçlara (2-3 cm) aşılmıştır. Aşılama işleminden sonra anaçların dip kısmı, Amerikan kestanesi ve fındık için 10 sn, asma için 5 sn olacak şekilde 1000 ppm IBA solusyonuna daldırılmıştır. Daha sonra aşıllanmış bitkiciklerin bir kısmı *in vitro* şartlarda torf ortamına aktarılmış, bir kısmı da *ex vitro* şartlarda torf ortamına aktararak kademeli bir şekilde dış ortam adaptasyonu sağlanmıştır. *In vitro* şartlarda tutulan sürgünlerde havai kökler oluşmuş ve aşılama işlemi başarısız olmuştur. Aşılama işleminden iki ay sonra *ex vitro* şartlarda tutulmuş bitkilerde yaşam oranı, asmada %50, fındıkta % 70, kestanede ise % 80 olarak saptanmıştır.

Mato ve Vieitez (2006) *in vitro* şartlarda, IBA uygulaması yapılmış kestane (*Castanea sativa* Mill.) sürgünlerinin alt ve üst kısımlarındaki IAA ve Oksin aktivitesini karşılaştırmalı olarak analiz etmiştir. Sürgün oluşumuyla oksin alt kısımlarda artmış, üst kısımlarda ise azalmıştır. Bunun yanında köklenme sürecinde sürgün alt kısımlarında IAA oksidaz aktivitesi azalırken üst kısımlarda artış göstermiştir. Bu biyokimyasal olaylar sürgünlerdeki köklenme bölgesinde IAA seviyesini arttırmıştır. Uygulama yapılmamış köklenme gerçekleşmeyen sürgünlerde IAA oksidaz aktivitesi üst kısımlarda düşük, alt kısımlarda yüksek olmuştur. Sonuçlar oksin uygulamasının çeliklerde içsel oksin seviyesini kontrol edebildiğini göstermiştir.

Kestane mikroçoğaltımında organogenesis teknikleri ile mikroçoğaltım dışında somatik embriyogenesis yolu ile üretime pek çok örnek bulunmaktadır. Somatik embriyogenesis teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalara örnek olarak Vieitez vd. (1990) farklı kestane hibritlerinin (*C. sativa* x *C. crenata*) olgun ve olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kültüre alarak somatik embriyo üretimini gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucu; 0.5–1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L 2,4-D ve 1–2 mg/L BA içeren ya da BA içermeyen MS temel besin ortamında embriyogenik kallus düşük oranda (%6–8) elde edilmiş ve embriyonik kalluslar 2,4-D içermeyen MS ortamına transfer edilmiştir. Çalışmada globular ve kalp şekilli somatik embriyolar elde edilmiş, bu embriyolar WPM ortamında olgunlaştırılmış, ancak çimlenme olmamıştır.

Amerikan kestanesinde (*C. dentata* (Marsh.) Borkh.) ovul ve olgunlaşmamış embriyoları kullanarak somatik embriyogenesis gerçekleştirilen farklı bir çalışmada 0.25 mg/l BA + 6 mg/l NAA ya da 4 mg/L 2,4-D ilave edilmiş WPM temel besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda 1 veya 2 hafta inkübasyondan sonra 0.25 mg/L BA içeren ya da içermeyen ortama eksplantlar transfer edilmiştir. Ayrıca eksplantların bir kısmı başlangıç ortamında alt kültüre alınmıştır. Çiçeklenmeden 6–7 hafta sonra kültüre alınan ovuller, 1–2 hafta bitki büyüme düzenleyici maddesi içeren ortamda tutulduktan sonra oksinsiz ortama alındığında radikula direkt somatik embriyogenesis meydana geldiği belirtilmiştir (Merkle vd., 1991).

Carraway ve Merkle (1997) Amerikan kestanesinde ovul ve olgunlaşmamış ya da olgun zigotik embriyoları kullanarak WPM ortamında, BA (0.25 mg/l) ve TDZ (0.1 mg/l)'nin, 2,4-D, IAA ve NAA (0.1, 0.5, 3.0, 10.0, 20.0 mg/l) ile oluşturduğu farklı kombinasyonlar denemişlerdir. İnkübasyon 25°C'de karanlıkta yapılmıştır. Somatik embriyolar WPM ortamında çimlendirilmiştir. Embriyogenik kültürler 3 mg/L 2,4-D ve 0.25 mg/L BA ilave edilmiş sıvı WPM ortamında çok hızlı gelişim göstermiştir. Aktif kömür (5 g/L) somatik embriyoların miktarını ve gelişimini iyileştirdiği gözlemlenmiştir.

Xing vd. (1999) tarafından Amerikan kestanesi (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.) bitkileri, somatik embriyogenesis yoluyla gelişen ovullerden rejenere edilmiştir. Başlangıç ortamında ovullerden proembriyonik kitleler gelişmiştir. Gelişen kitleler gelişme ortamında dört hafta süre ile kültüre alınmıştır. Başlangıç somatik embriyoları sürgün meristemleri ve radiküller gelişinceye kadar

olgunlaştırma ortamında en az bir ay süre ile gelişmiştir. Tüm geliştirme ve olgunlaştırma ortamlarında Gamborg'un B-5 temel besin ortamı kullanılmıştır. Kotiledon aşamasından sonra her bir gram proembriyonik kitleden 86–586 arası değişen sayıda embriyo oluştuğu belirtilmiştir. Çimlenen embriyoların ise % 6,3 oranında sürgün oluşturduğu ve % 3.3 oranında bitkicik oluşturduğu bildirilmiştir.

San-Jose vd. (2001) Avrupa kestanesi embriyo, hipokotil, epikotil ve kotiledon eksplantlarını kullanarak, embriyo çimlendirilmesi için MS temel besin ortamı (0.1 mg/L TDZ ya da 1 mg/L BA ilave edilmiş); sürgün oluşumu için MS besin ortamı (farklı TDZ dozları+0.01 mg/L NAA ilave edilmiş), alt kültürler için TDZ içermeyen düşük BA dozları kullanılmıştır. Sürgün gelişimi sadece kotiledon eksplantlarda meydana gelmiştir. Çimlenme için BA; sürgün oluşumu için 1-2 mg/l TDZ en uygun doz olarak bulunmuş, sürgün uzaması 0.05 mg/L BA içeren GD ortamında sağlanmıştır. 21 klonun 16'sında köklenmenin gerçekleştiği görülmüştür.

Vieitez ve Vieitez (2006) BAP içeren besin ortamında kestane embriyonik ekseninin izolasyonu ile yan sürgün gelişimini gerçekleştirmiştir. Çalışmada embriyonik dokudan ve alt kültürü yapılan sürgünlerden meydana gelen yan sürgün gelişimi için optimum BAP konsantrasyonları belirlenmiştir. İlk yıl sürgün çoğaltımından sonra çoğalma oranında önemli bir değişme olmadan arka arkaya çok sayıda sürgün elde edilmiştir.

Şan vd. (2007) dört Avrupa kestane çeşidinde (Hacibiş, Karamehmet, Osmanoğlu ve Sariaşlama) tam çiçeklenmeden 5. 6. 7 ve 8 hafta sonra toplanan serbest tozlanmış tohumların olgunlaşmamış kotiledonlarını, DKW ceviz ortamında kültüre alarak somatik embriyogenesis gerçekleştirmişlerdir. Embriyonik kotiledon yüzdesi ve embriyonik kotiledon başına embriyo sayısı ikinci alt kültürün sonunda kaydedilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, embriyogenesis oranının %40-70 ve embriyogenik kotiledon başına embriyo sayısının 4.04-7.70 arasında değiştiği görülmüştür. Tam çiçeklenmeden 5, 6 ve 7 hafta sonra toplanmış kotiledonlarda daha çok embriyogenesis olduğu bildirilmiştir.

Corredoira vd., (2008) Avrupa kestanesinde somatik embriyogenesis üzerine bir çalışma gerçekleştirmiş ve somatik embriyolarda çimlenme düzeyinin artırılması amacıyla farklı uygulamalar yapmışlardır. Somatik embriyolar önce büyüme düzenleyici madde içermeyen MS ortamı (makro elementleri ½ düzeyinde, %3

maltoz ve %0.7 agar ilave edilmiş) (olgunlaştırma ortamı) üzerinde 4 hafta süreyle kültüre alınmış ve daha sonra çimlendirme ortamlarına transfer edilerek 4°C’de 2 ay soğuklatılmıştır. Çimlendirme uygulamaları 1) kısmi olarak yavaş ya da hızlı kurutma, 2) çimlenme ortamına büyüme düzenleyici maddeleri (BA, NAA ya da IBA) veya glutamin ilavesi olacak şekilde yapılmıştır. En iyi sonuç somatik embriyoların laminar hava akışlı kabin içerisinde 2 saat süreyle hızlı kurutma yapılması ile elde edilmiştir. Embriyolarda nem kapsamı %57-58’dir. Çimlenme ortamına (%16-19) 0.44 µM BA ve 200-438 mg/L glutamin ilavesi rejenerasyonu artırmıştır. Bitki kalitesi için BA’nın yanında 0.49 µM IBA’nın olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir.

2.2. Sıvı Ortamda Yapılmış Bazı Mikroçoğaltım Çalışmaları

Raghuvanshi ve Srivastava (1995) mango bitkisinde, fenolik madde salgısının gelişmeyi olumsuz etkisini azaltmak için sıvı kültür kullanarak eksplantlara ön uygulama yapılmasının etkilerini araştırmıştır. 250 ml’lik erlenmayerlerde, 75 rpm çalkalama hızında çalıştırılan karıştırıcıda eksplantlar sıvı MS ortamında tutulmuşlardır. Sıvı kültür kullanarak eksplantlara ön uygulamalar yapılmasının *in vitro* kabiliyetini artırdığı belirtilmiştir.

Tewary ve Oka (1999) dutun (*Morus indica*) koltuk altı tomurcukları ve sürgün uçlarını sıvı MS ortamında kültüre almıştır. Bitki eksplantları 120 rpm çalkalama hızında 6 hafta süre ile aynı ortamda kültüre alınmıştır. İlk dört hafta süresince sürgün oluşumu ve uzaması görülmüş, bu süreyi takip eden iki haftada ise sürgünlerde köklenme meydana gelmiştir. Aynı ortamda tek aşamalı sıvı kültürün; dutun düşük işgücü maliyetli ve etkili çoğaltımı için uygun bulunduğu belirtilmiştir.

Grigoriadou vd., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, VITRO Yunanistan S.A laboratuvarında dizayn edilen bir geçici daldırma sistemi (TIS) zeytin mikro sürgünlerinin sıvı kültürü için kullanılmıştır. Bu sistem; kontrol olarak kullanılmış katı agar ortamı, LifeReactor ve çalkalamalı erlenmayer sıvı kültür sistemleri ile WP ortamında karşılaştırılmıştır. Kültürün 30. gün sonunda, çalkalamalı erlenmayer sıvı kültüründe eksplant başına 1.93 sürgün gelişimi ile en yüksek sonuç elde edilmiştir. Geçici daldırma sisteminin (TIS) sonuçları (eksplant başına 1.93 yeni sürgün, 0.95 cm sürgün uzunluğu) istatistiksel olarak kontrol katı kültürle aynı çıkmış, LifeReactor de ise en düşük sonuç elde edilmiştir.

Ancak, tüm sıvı kültürler vitrifikasyondan zarar görmüştür. En yüksek vitrifikasyon zararının erlenmeyer kültüründe, en düşük zararın ise geçici daldırmalı sistemde (TIS) görüldüğü bildirilmiştir.

Shim (2002)'ye atfen Paek (2005) tarafından ele alınan bir çalışmada, asma 5BB klon anacının boğumları balon-tipi kabarcıklı biyoreaktörde; daldırmalı ve akışkan, oksijen destekli raft (sandal) kültürü ve oksijen desteksiz raft kültürü şeklinde üç farklı kültür metoduyla çoğaltılmıştır. Bitkicikler oksijen destekli raft kültüründe en iyi gelişimi göstermişler ve maksimum yaş ağırlık, kuru ağırlık ve sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Deneylerde kullanılan boğumların morfolojik pozisyonu gelişmeyi ve yaşam gücünü etkilemiştir. Üst bölümlerden alınan boğumların en iyi eksplant kaynağı olduğu bulunmuştur.

Zhu LÍ-Hua vd. (2005) RITA kaplarında geçici daldırma prensibi ile elma M26 klon anacının mikroçoğaltımını gerçekleştirmiştir. Çalışmada farklı tipte ve boyutlarda eksplantlar ile farklı gelişme düzenleyicilerinin (BAP, kinetin ve IBA) etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışmada sürgün çoğalması döneminde, sürgün uzaması dönemine kıyasla daha çok sitokin gereksinimi olduğu görülmüştür. Sürgün sayısı ve sürgün kalitesi açısından en iyi üretimin; sürgün çoğalması döneminde 4.4 mmol BAP ve 0.5 mmol IBA kullanımıyla elde edildiği, sürgün uzama döneminde ise 1.1 mmol BAP ve 0.5 mmol IBA kullanarak elde edildiği tespit edilmiştir. RITA kaplarında bitki eksplantlarının besin ortamına günde 16 kez daldırmasıyla, günde sekiz kez daldırma yapılmasına göre daha yüksek çoğalma oranı ve daha yüksek sürgün uzunluğu elde edildiği saptanmıştır.

Roschke ve Pijut (2007) tarafından, selekte edilmiş kara ceviz çöğür genotiplerinin yarı-katı DKW ortamında sürgün kültürü kurulmuştur. Gelişen mikro sürgünlerde boğumlar kesilerek sıvı DKW ortamına aktarılmıştır. Çalkalayıcıda 100 rpm hızla kültüre alınan boğumlarda bulunan tomurcuklar patlamış ve sürgün salkımı şeklinde gelişmiştir. Salkımlarda bulunan mikrosürgünlerin boğumları kesilerek kültür kaplarında geliştirilmiştir.

Chakrabarty (2007) iki farklı biyoreaktör tipi (geçici ve sürekli daldırmalı 3L balontipi) kullanarak M9 EMLA elma klon anacının *in vitro* çoğalma sürecindeki, gelişme ve fizyolojik parametreleri araştırmıştır. M9 EMLA elma klon anacının boğumları yarı-katı MS ortamında geliştirilmiş ve dört hafta süre sonunda gelişen sürgünlerden tekli boğumlar kesilerek sıvı MS ortamında biyoreaktörde kültüre

alınmıştır. Sürekli daldırmalı biyoreaktörde, sürgünler tüm kültür periyodu süresince sıvı ortam içinde tutulmuşlardır. Geçici daldırmalı biyoreaktörde ise sürgünler her gün 4 kere 15 dakika daldırılacak şekilde programlanmıştır. Bu çalışma sonucu geçici daldırmalı biyoreaktörden elde edilmiş sürgünler, sürekli daldırmalı biyoreaktörden elde edilmiş sürgünlere göre daha yüksek kuru ağırlığa ve kaliteye sahip olmuşlardır. Düşük kuru ağırlığa sahip sürekli daldırmalı biyoreaktörde gelişmiş sürgünlerin yaprakları %91.2 su içeriğine sahip iken, geçici daldırmalı biyoreaktördeki sürgün yaprakları %83.4 oranında su içerdiği görülmüştür. Vitrifikasyon sürekli daldırmalı kültürlerde, geçici daldırma yapılan kültürlerle göre daha yüksek oranda görülmüştür. Kültür süresi sonunda üretilmiş bitkicikler, ex vitro köklenme ve alıştırma için hidroponik ortamlara taşınmışlardır.

Choi vd., (2008) tarafından yapılmış bir çalışmada, bitkilerin biyoreaktör kültürlerinde, inokulum yoğunluğu bitkiciklerin gelişimini ve çoğalmasını etkileyen önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada; biyoreaktörlerde 5BB asma anacının sürgün gelişimini ve çoğalmasını arttırmak için, 3 litre balon-tipi biyoreaktörde 40 gün süresince 15, 30, 45, 60'lı tekli boğum uygulamaları yapılmıştır. Biyoreaktörde inokulasyon yoğunluğu, bitkiciklerin gelişme ve fotosentez kapasitelerini önemli derecede etkilemiştir. İnokulasyon yoğunluğu 45 boğum olan kültürde en iyi gelişme (910.4 mg/sürgün yaş ağırlığı, 764.4 mg/kök yaş ağırlığı) gözlenmiştir. En iyi gelişmeyi 30 boğumlu kültür takip etmiştir. En yüksek CO₂ asimilasyon oranı ve terleme oranı 45 boğumlu inokulasyonlarda görülmüştür. 60 boğumlu inokulasyonda sürgün ve kök gelişiminde önemli derecede düşüşler meydana geldiği gözlenmiştir (426.5 mg/sürgün yaş ağırlığı, 284 mg/kök yaş ağırlığı). İnokulum yoğunluğu 15 boğuma düştüğünde, bitkiciklerde en yüksek vitrifikasyon ve terleme oranı ile en düşük CO₂ asimilasyon oranı görülmüştür.

Özden vd. (2010) tarafından yürütülen bir çalışmada 'Edremit yağlık' çeşidine ait zeytin fidanlarından alınan nodal tomurcukları kullanarak mikroçoğaltım için farklı karbon kaynaklarının (sukroz, mannitol ve glikoz) ve bitki büyüme düzenleyicilerinin (zeatin ve dikegulak) etkileri, hem yarı katı besin ortamı hem de geçici daldırmalı biyoreaktör sistemleri (TIS) kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre mikroçoğaltım için sıvı besiyerine karbon kaynağı olarak sadece mannitol eklenmesi gerektiği görülmüştür. Yarı-katı besiyerinde çoğaltılan zeytin

gövdelerinde güçlü apikal dominans nedeniyle daha çok tekli gövde oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak TIS sistemi kullanıldığında bitki eksplantlarında dominansın kırıldığı ve yanal gövdelerin gelişme göstererek, çoklu gövde oluşumunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yine TIS sisteminde besi ortamına zeatine ek olarak, dikegulak eklenmesinin çoklu gövde oluşumu üzerine olumlu etkisi olduğu saptanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Aralık 2010-Temmuz 2012 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Materyal

“Aydın İli Nazilli İlçesi Kestanelerinin Seleksiyon Yolu ile ıslahı Üzerinde Araştırmalar” isimli (TÜBİTAK-TOGTAG 2835 nolu proje) sonuçlanan proje ile genel kalite, irilik, erkencilik ve kestane hamuru yapımına uygunluk bakımından seçilmiş kestane genotiplerine ait ağaçların dal ve sürgünleri çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur (Ertan vd., 2007).

Denemede kullanılan kestane dal ve sürgünleri Nazilli İlçesi Sinekçiler, Kuşçular ve Kavacık köylerinde bulunan sırası ile N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 no'lu genotiplerden alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür ortamları ve hazırlığı

Temel besin ortamı olarak Avrupa kestanelerinin mikroçoğaltımında yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda kullanılan Gresshoff and Doy (GD) ve yarı nitrat konsantrasyonlu Murashige and Skoog (MS) mineral ortamları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan MS ve GD ortamları içerikleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS ve GD ortamlarının içerikleri

Besin ortamı Kimyasal madde	MS ortamı (mg/L)	GD Ortamı (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	1000
KNO ₃	1900	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-
CaNO ₃	-	241.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	-
MgSO ₄	-	17,099
KH ₂ PO ₄	170	-
K ₂ PO ₄ Monobasic	-	300.0
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	1.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	0.3
H ₃ BO ₃	6.2	0.3
KI	0.83	0.8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ -EDTA	37.3	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.85
Molybic Acid (Sodium Salt).2H ₂ O	-	0.025
Potassium Chloride	-	65.0
D-Biotin	-	0.2
Mezo-inositol	100	10
Glycine	2.0	4.0
Thiamine HCl	0.1	1.0
Pyridoxine HCl	0.5	0.1
Nicotinic Asit	0.5	0.1

Kaynak: Sigma BioSciences Katalog (1996)

Besin ortamlarının hazırlık aşaması stok solüsyonlardan gerekli miktarlarda pipet yardımıyla sıvı çekilerek bir erlenmayer içerisinde steril saf su ile belirli miktara tamamlanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan GD ve MS (1/2 Nitrat) temel besin ortamları başlangıç ve çoğaltım ortamları olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanmıştır. GD başlangıç ortamı 0.5 mg/l BA, sürgün çoğaltımında 0.1-0.2 mg/l BA içerecek şekilde hazırlanmıştır. MS (1/2 Nitrat) başlangıç ortamı 0.1 mg/L GA3, 0.1 mg/L IBA ve 1mg/L BAP içerecek şekilde hazırlanmıştır. MS (1/2 Nitrat) çoğaltma ortamı ise sadece 1 mg/L BAP içermiştir. Besin ortamlarında katılaştırıcı olarak 8 g/L difco bacto agar, şeker olarak 30 g/L sakkaroz kullanılmıştır. Ortamların pH değeri 1.0 N HCl ve 1.0 N NaOH kullanarak 5.7'ye ayarlanmıştır (Vieitez vd., 2007). Hazırlanan besin ortamının 121 C'de 1,2 kg/cm² basınç altında 35 dk (500 mL için) otoklavda (Hirayama 25 L) tutularak sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve besin ortamı steril kabin içerisinde steril petrilere dökülerek soğutulmaya bırakılmıştır. Tüm kültürler 16 saat fotoperiyotta, 30 µmol m²s⁻¹ ışık şiddetinde ve 25 °C sıcaklıkta iklim odasında tutulmuştur.

3.2.2. Bitkisel materyalin hazırlığı ve dikim

Çalışma kültürlerde meydana gelen kayıplar nedeniyle 2011-2012 yılları arasında farklı dönemlerde kurularak yürütülmüştür.

1. Dönem: 27.12.2010 tarihinde Kuşçular, Sinekçiler ve Kavacık köylerinde seçilmiş kestane genotiplerinden dormant gözler barındıran dallar kesilmiştir. Kesilen dallar benomyl etken maddeli Safomyl adlı fungusitle (200mg/l) ilaçlanarak nemli şartlar altında 4 C'de buzdolabına kaldırılmış ve 19.01.2011 tarihinde buzdolabından çıkarılmış ve çelik hazırlanarak steril perlite dikilmiştir. Çelikler iklim odasında 25 °C'de 16 saat fotoperiyotta tutularak tomurcuklar sürdürülmüştür. Tomurcukların sürmesinden 15-20 gün sonra sürgünler toplanarak eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Toplanan sürgünlerin yaprakları uzaklaştırılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bunun için sürgünler musluk suyu altında yıkandıktan sonra %70 ethanole 30 s, ve 2-3 damla Tween 80 içeren % 20 ticari sodyumhipoklorid solusyonuna 15 dk süre ile daldırılmış ve steril distile su ile 3 defa 5'er dk olacak şekilde durulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Dezenfekte edilen sürgünlerden sürgün uçları ve boğumlar (başlangıç eksplantları) 5 mm uzunluğunda kesilmiştir. Eksplantlar GD başlangıç ortamı içeren petri kaplarına dikey olarak yerleştirilmiştir. Başlangıç eksplantları 24 saat sonra ortamda kararma ve eksudasyonun zararlı etkilerini azaltmak için, aynı petride

farklı yere taşınmış ve daha sonra eksplantlar her iki haftada bir taze ortama transfer edilmiştir

2. Dönem: 01.04.2011 tarihinde seçilmiş kestane genotiplerinden dormant gözler barındıran dallar kesilmiştir. Benomyl etken maddeli Safomyl ticari isimli fungusitle (200mg/l) ilaçlanan çelikler 21.04.2011 tarihinde steril perlite dikilmiş ve tomurcukların patlayarak sürmesi sağlanmıştır. Bu sürgünlerin uçları ve boğumları GD ortamında kültüre alınmıştır.

3. Dönem: 22.05.2011 tarihinde seçilmiş kestane genotiplerinden sürgünler kesilmiştir. Sürgünlerden alınan boğumların ve sürgün uçlarının sterilizasyon işleminden sonra GD besin ortamına dikim işlemi gerçekleştirilmiştir.

4. Dönem:18.11.2011 tarihinde seçilmiş genotiplerden üzerinde dormant tomurcuklar bulunan dallar kesilmiştir. Kesilen dallardan hazırlanan çelikler iklim odasında 25 °C'de 16 saat fotoperiyotta steril nemli perlite dikilmiştir. Çelikler tomurcukların kabarmasına kadar nemli şartlarda tutulmuştur. 18.01.2012 tarihinde kabaran tomurcuklarda açılma gerçekleşmeden yaklaşık 0,5 cm odun parçası barındıracak şekilde boğumlar kesilmiş ve sterilize edilerek tomurcukların yaprak taslakları soyulmuştur. GD ortamında, tekerrürde 45 tomurcuk olacak şekilde 3 tekerrürlü deneme kurulmuştur. GD ortamında kültüre alınan tomurcuklar 01.03.2012 tarihinde ½ Nitrat konsantrasyonlu MS ortamına aktarılmıştır.

5. Dönem: 29.03–09.04.2012 tarihleri arasında kestane genotiplerinden tekrar dallar kesilmiş ve tomurcukların ½ Nitrat konsantrasyonlu MS ortamına dikimi gerçekleştirilmiştir. Her genotipten 15'er tomurcuk içerecek şekilde beş tekerrür oluşturulmuştur.

6. Dönem: 17.05.2012 tarihinde kabarmış ve sürgün oluşturmuş tomurcuklar sterilize edilerek sıvı kültüre transfer edilmiştir. 100 mL'lik erlenmayerlere 40 mL sıvı ½ nitrat konsantrasyonlu MS ortamı dökülmüş ve her erlende 5'er tomurcuk olacak şekilde 4 tekerrürlü deneme kurulmuştur. Çalkalayıcı (IKA KS 260) hızı 100 rpm hızına ayarlanmış ve 16 saat fotoperiyotta, 25 C'de iklim odasında kültürler tutulmuştur. Sıvı ortamda bulunan tomurcuklar ve boğumlar 4-5 günde bir taze ortama aktarılmıştır.

7. Dönem: 20.06.2012 tarihinde Sinekçiler, Kuşçular ve Kavacık köylerinde seçilmiş kestane genotiplerinden sürgünler kesilmiştir. Doku kültürü laboratuvarına getirilen sürgünler 0.5 cm uzunluğunda boğumlar şeklinde kesilerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra steril kabin içerisinde boğumlar 40 mL ½ nitrat konsantrasyonlu sıvı MS ortamı içeren 100 mL'lik erlenmayerlere aktarılmıştır. Her erlenmayerde 5 boğum bulunacak şekilde 4 tekerrürlü deneme kurulmuştur.

Denemede yarı katı ortamlarda kurulan GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) kültürleri; tomurcuk kabarması, sürgün gelişmesi, yaprak sayısı ve kararma gibi parametreler esas alınarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen değerler, TARİST istatistiksel analiz programında 'Tesadüf Parselleri' deneme desenine göre değerlendirilerek varyans analizi yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıkların ortaya konması için LSD testi kullanılmış ve buradan çıkan sonuçlara göre ortalamalar gruplandırılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. 2011 Yılı Denemeleri

Aydın İli Nazilli İlçesi kestaneliklerinde, seçilmiş N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 kestane genotiplerinden Aralık 2010 (1. Dönem) tarihinde alınan çeliklerin perlit ortamında sürdürülmesiyle elde edilen boğumlar ve sürgün uçları GD besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürlerde kısa sürede fenolik madde salgısından kaynaklanan kararmalar ve gelişen yoğun enfeksiyon nedeniyle kısa sürede tüm kültürler kaybedilmiştir. Ayrıca dikimi yapılan eksplantlarda boğum ucundan geriye doğru kurumalar gerçekleştiği tespit edilmiştir.

İlk denemede yaşanan kayıplar nedeniyle Nisan 2011 (2.Dönem) ve Mayıs 2011 (3.Dönem) tarihlerinde aynı genotiplerden tekrar dal ve sürgünler kesilmiş ve yeni bitki eksplantları elde edilmiştir. Boğum ve sürgün uçlarının GD besin ortamına dikilmesiyle oluşturulan kültürlerde, ilk denemede yaşanan sorunlarla karşılaşmıştır. Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi kültür süresince düşük enfeksiyon oranı görülmesine rağmen, bitki eksplantlarında kararmalar ve kurumalar meydana gelerek yeni sürgün oluşumu gözlenmemiş ve çoğaltım yapılamamıştır.



Şekil 4.1. Mayıs 2011 tarihinde kültüre alınan N-3-4 genotipinde dikimden 1 hafta sonra meydana gelen kararma

4.2. 2012 Yılı Denemeleri

4.2.1. Yarı-Katı GD ve MS ortamları

Ocak 2012 tarihinde yarı-katı GD ortamında kültüre alınan tomurcuklar 6 hafta sonra $\frac{1}{2}$ nitrat içeren yarı-katı MS ortamına aktarılmıştır (4.Dönem). Ayrıca Mart 2012 tarihinde tekrar alınan kestane dallarından çıkarılan tomurcuklar, $\frac{1}{2}$ nitrat içeren yarı-katı MS ortamında kültüre alınmıştır (5. Dönem). Her iki denemede tomurcuk kabarması, yapraklanma, yaprak sayısı, sürgün gelişimi, kararma ve enfeksiyon oluşma durumları değerlendirilmiştir.

4.2.1.1. Tomurcuk Kabarması

GD+MS ve MS ortamlarında kültüre alınan kestane genotiplerinde kabaran tomurcuk oranları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

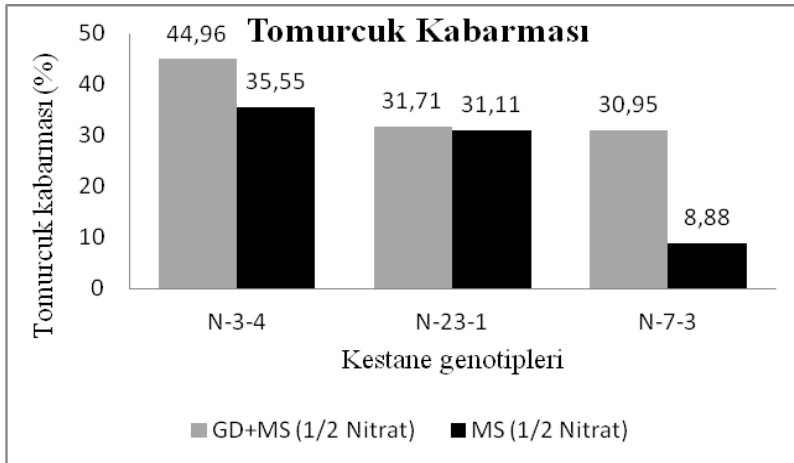
Kültüre alınan bazı tomurcuklarda dikimden birkaç gün sonra kabarma gözlenmiştir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.). Kestane genotiplerinin kabaran tomurcuk oranları, yapılan varyans analizi sonucuna göre besin ortamları arasında ve kullanılan genotipler arasında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Çizelge 4.1.de görüldüğü gibi kabaran tomurcuk oranı GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında %35.87 iken, MS (1/2 Nitrat) ortamında %28.52 olmuştur. Aynı şekilde kestane genotipleri kabaran tomurcuk oranı açısından incelendiğinde, N-3-4 genotipi (%40.26) istatistiksel olarak, N-23-1 (%31.41) ve N-7-3 (%24.92) genotiplerinden ayrı grupta yer almıştır. Genotip*Ortam interaksiyonları incelendiğinde GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında N-3-4 (%44.96) genotipi en yüksek kabaran tomurcuk oranını (%44.96) gösterirken, bu genotipi N-23-1 (%31.71) ve N-7-3 (%30.95) genotipleri izlemiştir. MS (1/2 Nitrat) ortamına dikilen genotiplere bakıldığında ise kabaran tomurcuk oranı %35.55 ile %8.88 arasında değişmiş, en yüksek oran (%35.55) N-3-4 genotipinde saptanmıştır (Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde kabaran tomurcuk oranları (%)

Ortam \ Genotip	TOMURCUK KABARMASI (%)		
	GD+MS (1/2 Nitrat)	MS (1/2 Nitrat)	Genotip ortalaması
N-3-4	44.96 (42.07)	35.55 (36.56)	40.26 (39.31) a
N-23-1	31.71 (34.24)	31.11 (33.89)	31.41 (34.06) b
N-7-3	30.95 (33.79)	8.88 (25.53)	24.92 (29.66) b
LSD %5	ö.d.		7.073**
Ortam ortalaması	35.87 (36.70) a	28.52 (31.10) b	
LSD %5	5.775*		

ö.d: Önemli değil *: p=0.05'e göre önemli **: p=0.01'e göre önemli

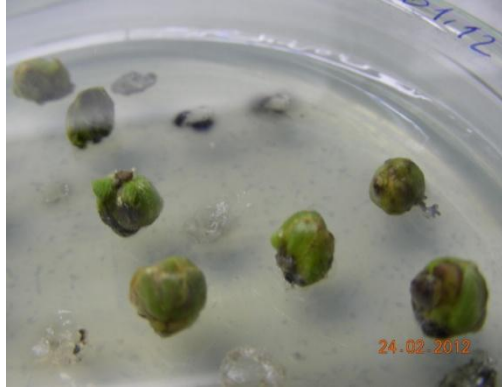
Veriler arc-sin moduna göre transforme edilerek varyans analizi yapılmış ve ortalamalar karşılaştırılmıştır. Çizelge içindeki değerler %, parantez içindeki değerler ise transforme edilmiş verilerdir.



Şekil 4.2. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin kabaran tomurcuk yüzdeleri



Şekil 4.3. GD ortamında kültüre alınan N-3-4 genotipinde boğumların dikimi



Şekil 4.4. GD ortamında kültüre alınan N-3-4 genotipinde meydana gelen kabarma

4.2.1.2. Sürgün gelişmesi

GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan kestane genotiplerinde sürgün gelişme oranları Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Dikimi yapılan tomurcukların bir kısmında sürgün oluşumu tespit edilmiş (Şekil 4.6.), tekrar çoğaltım yapılabilecek uzunluğa erişebilen sürgün oranının düşük düzeyde kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.7). Oluşan sürgünlerin Yapılan varyans analizi sonucuna göre kullanılan besin ortamları ve genotipler arasında istatistiksel açıdan farklar bulunmuştur. Sürgün gelişme oranı, MS (1/2 Nitrat) ortamında ortalama %41.48, GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında %25.52 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.2.). MS (1/2 Nitrat) ortamında elde edilen sonuçlara benzer olarak, Mert ve Soylu, (2009); Soylu ve Ertürk, (1998); Tetsumura ve Yamashita, (2004); Osterc vd., (2005) sürgün elde edilmesi için en uygun ortamın MS (1/2 NH₄NO₃-KNO₃) ortamı olduğunu bildirmektedirler. Chauvin ve Saless, (1988) ise başarılı kültür başlatma oranlarının genotipe, ana bitkinin yaşına ve kültür başlatma tarihine bağlı olarak %0-90 arasında değişebildiğini belirtmiştir. MS (½ Nitrat) ortamında, genotiplerde gelişen sürgün oranına bakıldığında, N-23-1 genotipinde en yüksek sürgün gelişme oranı (%47.48) elde edilirken, bu genotipi N-3-4 (%45.45) ve N-7-3 (%31.11) no'lu genotipler izlemiştir (Şekil 4.5.). Mert ve Soylu, (2009), MS (1/2 NH₄NO₃-KNO₃) besin ortamı kullanarak farklı kestane çeşitlerinde %37.50 ile %90.00 arasında değişen oranlarda sürgün oluşumu elde etmişlerdir.

Çizelge 4.2. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde gelişen sürgün oranları (%)

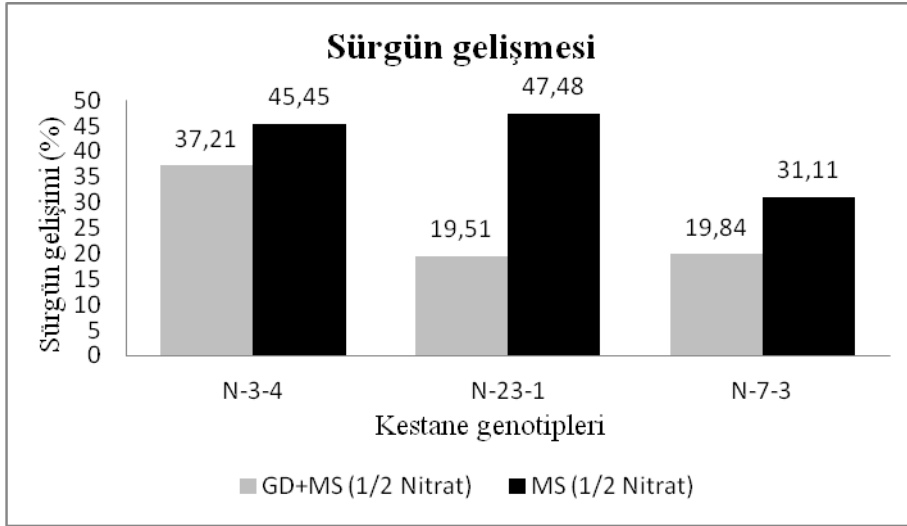
Ortam Genotip	SÜRGÜN GELİŞMESİ (%)		
	GD+MS(1/2 Nitrat)	MS (1/2 Nitrat)	Genotip ortalaması
N-3-4	37.21 (37.56)	45.45 (42.44)	41.38 (40.00) a
N-23-1	19.51 (26.18)	47.48 (43.71)	33.64 (34.95) ab
N-7-3	19.84 (26.39)	31.11 (22.29)	25.47 (29.84) b
LSD %5	ö.d.		9.638*
Ortam ortalaması	25.52 (30.05) b	41.48 (39.815) a	
LSD %5	7.870**		

ö.d: Önemli değil

*: p=0.05'e göre önemli

** : p=0.01'e göre önemli

Veriler arc-sinüs moduna göre transforme edilerek varyans analizi yapılmış ve ortalamalar karşılaştırılmıştır. Çizelge içindeki değerler %, parantez içindeki değerler ise transforme edilmiş verilerdir.



Şekil 4.5. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan

N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin sürgün gelişim yüzdeleri



Şekil 4.6. MS ½ Nitrat ortamına dikimi yapılan N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde sürgün oluşumu



Şekil 4.7. GD+MS ½ Nitrat ortamına dikimi yapılan N-3-4 genotipinde çoğaltım yapılabilecek uzunluğa gelen sürgün

4.2.1.3. Yaprak Sayısı

GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde elde edilen ortalama yaprak sayıları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Kestane genotipleri yaprak sayıları açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamları arasında istatistiksel olarak önemli farklar tespit edilmiştir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi MS (1/2 Nitrat) ortamında ortalama 6.47 yaprak sayısı elde edilirken, GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında ortalama 5.16 yaprak sayısı elde edilmiştir. Kullanılan kestane genotipleri arasında yaprak sayıları açısından istatistiksel önemde fark tespit edilmezken, N-3-4 genotipinde 6.39, N-7-3 genotipinde 5.61, N-23-1 genotipinde ise ortalama 5.46 yaprak sayısı elde edilmiştir. İstatistiksel öneme sahip olmamakla birlikte genotip*ortam interaksyonu incelendiğinde GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamında kültüre alınan genotiplerden N-3-4 genotipinin MS (1/2 Nitrat) ortamında en yüksek ortalama yaprak sayısını (7.19) verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).

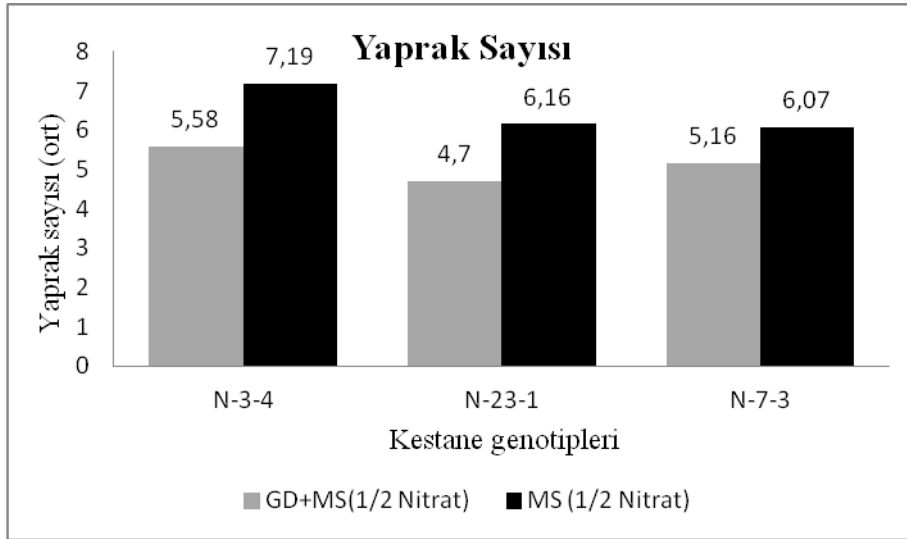
Çizelge 4.3. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan kestane genotiplerinde elde edilen ortalama yaprak sayıları (adet)

Ortam \ Genotip	YAPRAK SAYISI (Adet)		
	GD+MS (1/2Nitrat)	MS (1/2 Nitrat)	Genotip ortalaması
N-3-4	5.58	7.19	6.39
N-23-1	4.70	6.16	5.46
N-7-3	5.16	6.07	5.61
LSD %5	Ö.d.		Ö.d.
Ortam ortalaması	5.16 b	6.47 a	
LSD %5	0.689**		

ö.d: Önemli değil

*: $p=0.05$ 'e göre önemli

** : $p=0.01$ 'e göre önemli



Şekil 4.8.GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin ortalama yaprak sayıları.



Şekil 4.9. N-7-3 genotipinde yaprak gelişimi

4.2.1.4. Kararma

GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan kestane genotiplerinde ortaya çıkan kararma oranları Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Kültüre alınan kestane genotiplerinin GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarındaki kararma yüzdeleri istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda kararma açısından ortamlar arası istatistiksel önemde farklılık gözlenmezken, kullanılan genotipler arası ve genotip*ortam interaksyonu açısından önemli farklılık göze çarpmıştır. Chevre vd., (1983)'e atfen Ellialtıoğlu (1999) kestane aksillar tomurcukları kültüre alındığında, ortamın tuz içeriğinde azaltma yapılarak ortamdaki kararmanın düşük düzeyde tutulabildiğini belirtmesine karşın, çalışmamızda daha düşük tuz içeriğine sahip MS (1/2 Nitrat) ortamında %14.44 oranında kararma gözlenirken, GD+MS ortamında %13.84 oranında kararma gözlenmiştir (Çizelge 4.4.). İstatistiksel açıdan öneme sahip genotiplerin kararma yüzdelerine bakıldığında, en yüksek kararma N-7-3 (%19.20) genotipinde görülmüştür. N-7-3 genotipini N-23-1 (%14.35) ve N-3-4 (%8.87) genotipleri izlemiştir. Mert ve Soylu (2009), 1mg/L BAP içerikli MS (1/2 Nitrat) ortamında çeşitler arasında %4.50-44.50 arasında değişen kararma yüzdeleri elde etmiş ve kararmanın genotiplere bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir. Genotip*ortam interaksyonları kararma yüzdeleri açısından incelendiğinde en düşük kararma GD+MS (1/2 Nitrat) besin ortamında N-3-4 (%7.75) genotipinde,

MS (1/2 Nitrat) ortamında N-3-4 (%10.00) ve N-7-3 (%10.00) genotiplerinde gözlenmiştir (Şekil 4.10.). Kültürü yapılan kestane genotiplerinde yara yerlerinden salgılanan fenolik bileşikler kararma yüzdelerini önemli derecede arttırmıştır. Bitki eksplantlarının düzenli olarak taze ortama alt kültürü yapılmasına karşın özellikle kültür başlangıcında fenolik madde salgısının fazla olması kayıplar yaşanmasına neden olmuştur. Benzer şekilde Mert ve Soylu (2009); Osterc vd., (2005); Sanchez ve Vieitez (1990) özellikle başlangıç eksplantlarında olmak üzere sürgün oluşumu esnasında da kararmalar tespit etmiş ve kayıplar yaşamıştır.

Çizelge 4.4. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinde kararan tomurcuk oranları.

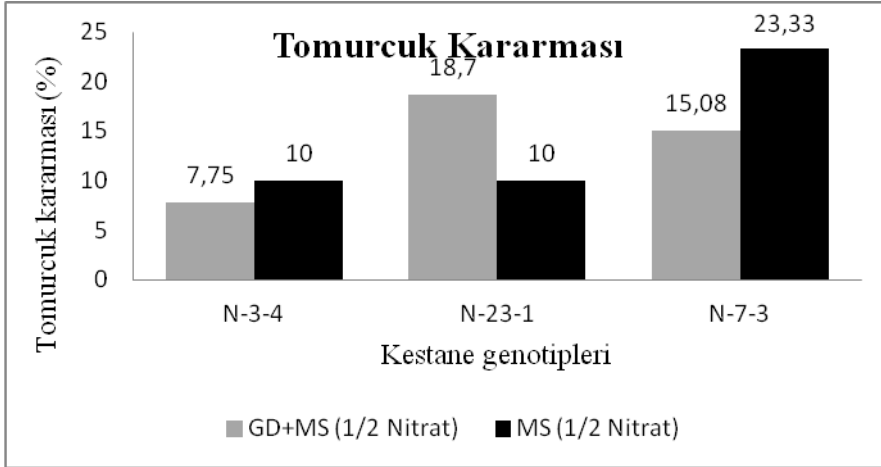
Ortam Genotip	TOMURCUK KARARMASI (%)		
	GD+MS (1/2 Nitrat)	MS (1/2 Nitrat)	Genotip ortalaması
N-3-4	7.25 (15.90) ö.d.	10.00 (18.27) ö.d.	8.87 (17.08) a
N-23-1	18.70 (25.61) b	10.00 (18.27) a	14.35 (21.94) b
N-7-3	15.08 (22.58) a	23.33 (28.85) b	19.20 (25.72) c
LSD %5	6.651**		4.703**
Ortam ortalaması	13.84 (21.36)	14.44 (21.79)	
LSD %5	ö.d.		

ö.d: Önemli değil

*: p=0.05'e göre önemli

** : p=0.01'e göre önemli

Veriler transforme edilerek varyans analizi yapılmış ve ortalamalar karşılaştırılmıştır. Çizelge içindeki değerler %, parantez içindeki değerler ise transforme edilmiş verilerdir. Çizelgedeki harflendirmeler besin ortamları arasındaki farklılığı belirtmektedir.



Şekil 4.10. GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerinin kararma gösteren tomurcuk yüzdeleri

4.2.2. Sıvı Kültür

Yarı-katı ortamda kültüre alınan kabarmış ve sürgün oluşturmuş tomurcukların sıvı kültüre transferi gerçekleştirilmiş (6. Dönem) ve çalkalayıcıda kültürlerdeki gelişim izlenmiştir (Şekil 4.11.). Bitki eksplantlarının sıvı kültüre aktarılmasını takip eden 3-4 günlük süre içinde sıvı ortamda fenolik madde salgısına bağlı kararmalar meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle bitki eksplantları kültür başlangıcından 3-4 gün sonra taze ortamlara aktarılmıştır. Aynı şekilde düzenli olarak tüm kültürler haftada bir kez olmak üzere yeni ortamlara aktarılmıştır. Kültür başlangıcından 10 gün sonra eksplantlarda kararmalar meydana geldiği görülmüştür. Bitki eksplantlarında, haftalık olarak taze ortama aktarma işlemi uygulanmasına rağmen kararmalar giderek artarak 3. haftada ölümler meydana gelmiştir. Bu süre içerisinde bitki eksplantlarında gelişme gözlenmemiştir.



Şekil 4.11. Sıvı ortam çalkalama kültürü

Haziran 2012 tarihinde (7. Dönem) kestane genotiplerinin sürgünleri kesilerek kurulan denemede bitki eksplantlarının sıvı MS (1/2 Nitrat) ortamında gelişimi izlenmiştir. MS (1/2 Nitrat) besin ortamı içeren sıvı kültüre aktarılan boğumlarda kültür başlangıcından 1 hafta süre sonunda kararmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Sıvı kültürün 3. haftasında sıvı kültürde boğumlar tamamen kararma göstererek gelişme görülmeden kaybedilmiştir. Denememizde kullanılan Avrupa kestanesi boğumları sıvı kültürde kararma göstererek gelişmemesine karşın, Roschke ve Pijut (2007) sert kabuklu meyve türlerinden Amerikan cevizinde DKW besin ortamında çalkalama kültürü gerçekleştirmiş ve başarılı sonuçlar almıştır. Çalışmada Amerikan cevizi boğumları kullanılmış ve boğumlar üzerinde bulunan tomurcuklar patlayarak yeni mikrosürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Grigoriadou vd., (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada, DKW besin ortamı kullanarak farklı zeytin çeşitlerinin gelişme durumları agar içerikli katı ortam ile çalkalamalı sıvı kültürde karşılaştırılmıştır. Çalışmada sıvı ortamda, katı kültüre göre daha yüksek gelişim elde edilmiş, ancak oluşan mikrosürgünlerde sürekli sıvı ortam ile temastan dolayı şiddetli vitrifikasyon görülerek zararlanma meydana geldiği belirtilmiştir. Literatürde sert kabuklu meyve türlerinden Amerikan cevizinin başarılı olarak sıvı ortamda mikroçoğaltımı (Roschke ve Pijut 2007) bir örnek olmasına rağmen, genel olarak odun dokulu bitki türlerinin sıvı ortama adaptasyonu oldukça düşük olmaktadır. Chakrabarty vd.,(2007) ve Zhu vd., (2005), tarafından elma klon anaçlarında ve Grigoriadou vd., (2005) tarafından

farklı zeytin çeşitlerinde yapılan çalışmalarda, geçici daldırma sistemli biyoreaktörlerde bitki eksplantları aralıklı olarak sıvı ortamda tutularak başarılı sonuçlar edilmiştir. Geçici daldırma sistemlerinin, sürekli daldırma sistemlerine ve çalkalama kültürüne göre daha başarılı sonuçlar elde etmesi, bitki eksplantlarının gelişme için havalanmayla sağlanabilen oksijene ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Çalışmada “Aydın İli Nazilli İlçesi Kestanelerinin Seleksiyon Yolu ile ıslahı Üzerinde Araştırmalar” isimli (TÜBİTAK-TOGTAG 2835 nolu proje) sonuçlanan proje ile 1. sırada seçilen N-3-4 nolu genotip (Sinekçiler Köyü), 3. sırada seçilen N-23-1 nolu genotip (Kuşçular Köyü) ve 6. sırada seçilen N-7-3 nolu genotip (Kavacık Köyü) bitki materyali olarak kullanılmıştır.

Çalışma kestane genotiplerinin GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamlarında yarı-katı ve sıvı kültürde gelişimlerini karşılaştırmak amacıyla 2011 ve 2012 yılları arasında yürütülmüştür. 2011 yılı denemesi genel olarak değerlendirildiğinde, GD yarı-katı besin ortamında kültüre alınan N-3-4, N-23-1 ve N-7-3 genotiplerine ait boğum ve sürgün ucu eksplantlarında, fenolik madde salgısından kaynaklanan kararma, boğum ucundan geriye doğru kuruma ve gelişen yoğun enfeksiyon nedeniyle tüm eksplantlarda kayıp gerçekleşmiş ve çoğaltım yapılamamıştır.

2012 yılı denemesi sonuçlarına genel olarak bakıldığında, kestane genotiplerinin gelişme seviyeleri, kullanılan GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) yarı-katı ortamlarında farklı bulunmuştur. GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında %25.51, MS (1/2 Nitrat) ortamında %41.48 oranında sürgün elde edilmiştir. Besin ortamı ve genotip birlikte değerlendirildiğinde ise GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında N-3-4 genotipinin (% 37.21) ve MS (1/2 Nitrat) ortamında ise N-23-1 genotipinin (% 47.48) en yüksek sürgün gelişim oranlarını verdiği görülmüştür.

Kabaran tomurcuk oranı açısından kullanılan besin ortamları ve genotipler incelendiğinde, GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında en yüksek kabaran tomurcuk değerleri elde edilirken, her iki besin ortamında da N-3-4 genotipi en yüksek değerleri göstermiştir.

GD+MS (1/2 Nitrat) ve MS (1/2 Nitrat) ortamları oluşan yaprak sayısı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptanmıştır. MS (1/2 nitrat) ortamında ortalama 6.47 yaprak sayısı oluşurken GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında ortalama 5.16 yaprak sayısı oluşmuştur. Her iki ortamda da N-3-4 genotipinin en yüksek değerleri verdiği tespit edilmiştir.

Kararan tomurcuk oranları ile ilgili değerler incelendiğinde, ortamlar arası önemli farklılıklar saptanmamış ve MS (1/2 Nitrat) ortamında GD+MS (1/2 Nitrat) ortamına kıyasla daha yüksek kararma gözlenmiştir. En düşük kararma yüzdeleri, GD+MS (1/2 Nitrat) ortamında N-3-4 genotipinde, MS (1/2 Nitrat) ortamında ise N-3-4 ve N-23-1 genotiplerinde saptanmıştır. Her iki ortamda da en yüksek kararma yüzdesi N-7-3 genotipinde görülmüştür.

Deneme genel olarak değerlendirildiğinde, kullanılan kestane genotiplerinden sürgün elde edilebilmesine rağmen, tekrar çoğaltım yapılabilecek uzunlukta oluşan sürgün oranı düşük düzeyde kalmıştır. Kestane mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmalarda genotipin, kültür başlatma tarihlerinin ve ana bitki durumunun gelişme durumlarını oldukça etkilediği belirtilmiştir (Chauvin ve Saless, 1988). Çalışmada kullanılan genotiplerin doku kültürü şartlarına az tepki vermesine bu tip faktörlerin etkili olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca kestane mikroçoğaltımında bitki eksplantlarının hazırlığında kesim yerlerinden kısa zamanda yüksek düzeyde fenolik madde salgılanmasının ve eksplantlarda görülen geriye doğru kurumaların başarılı kültür başlatımına engel olduğu belirlenmiştir. Kestane mikroçoğaltımında bu tip sorunların çözümüne yönelik çalışmalara ağırlık verilmelidir.

Sıvı ortamda çalkalama kültürü sonuçlarına bakıldığında, bitki eksplantlarında kararmalar meydana gelmiş ve kültürde gelişme gözlenmeden kayıplar yaşanmıştır. Kestane eksplantlarının sıvı ortamla devamlı temas halinde tutulmasından kaynaklanan havasız ortam, kültürlerin kaybedilmesine yol açmıştır. Kestane gibi odun dokulu bitki türlerinin sıvı ortamda mikroçoğaltımı için, biyoreaktörler gibi havalandırma olanakları bulunan ve bitkileri belirli sürelerde sıvı ortamda tutan geçici daldırmalı otomatize sistemlerin kullanılmasının daha başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Ayrıca sıvı ortamda kontaminasyon gerçekleşmesi durumunda, enfeksiyonun tüm sıvı ortama yayılması önemli bir sorun oluşturmaktadır

KAYNAKLAR

- Altman, A., Loberant, B. 2000. Micropropagation of plants, principles and practices. In: Spier, (R.E.; Griffiths, B. And Scragg, A.H., Eds.), **The Encyclopaedia of Cell Technology**. ISBN: 0-471-16123-3, John Wiley and Sons, Inc., pp. 916-929, New York.
- Anonim, 1996 Sigma BioSciences Pflanzenzellkultur Katalog. Eriřim Tarihi: 25.02.2012
- Anonim, 2003 T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Aydın İl Müdürlüğü Kayıtları, Aydın Eriřim Tarihi: 05.06.2012
- Anonim, 2010 www.fao.org. Dünya kestane üretim miktarı kayıtları. Eriřim Tarihi 18.07.2012
- Ballaster, A., Bourrain, L., Corredoira, E., Gonçalves, J.C., Le, C-L., Miranda Fontaina, M.E., San-Jose, M.C., Sauer, U., Veitez, A.M., Wilhelm, E., 2001. Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. **Forest Snow Landscape Research**, 76: 460-467.
- Ballester, A., Bourrain, L., Corredoira, E., Gonçalves, J.S. 2001. Improving chesnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. **Forest Snow Landscape Research**, 76 (3): 460-467.
- Carraway, D.T., Merkle, S.A., 1997. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. **Canada Journal Forest Research**, 27: 1805-1812.
- Celiktas, ., Grel A., Sukan, F.,2010. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors, Transworld Research Network 2010: 1- 54 ISBN: 978-81-7895-474-5
- Chakrabarty, D., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., Data, S.K., Paek, K.Y. 2007. The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock ‘M9 EMLA’ in temporary versus continuous immersion bioreactors. **Plant Growth Regul. Springer**, 51: 11-19.

- Chauvin, J.E., Salesses, G., 1988. Advances in chestnut micropagation (*Castanea* sp.). **Acta Horticulturae**, 227: 340-345.
- Delen, N., 1992. Ege Bölgesi' nde yeni bir hastalık: Kestane Kanseri. **Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, TYUAP Ege-Marmara Dilimi, Bahçe Bitkileri Grubu Abav Toplantısı**, (3-6 Kasım 1992), Menemen-İzmir.
- Dey S., 2005. Cost-effective mass cloning of plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. In Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Huaslef-eide A.K, Preil, w.Eds. **Springer**, PUBLISHING pp.127-141,
- Elliialtıoğlu, Ş., 1999. Doku kültürü yoluyla vegetatif çoğaltmada doku kararması sorunu, nedenleri ve çözüm yolları. **Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi**, 24 (1): 37-47.
- Erdem, R., 1951. Türkiye' de Kestane Ölümünün Sebepleri ve Savaş İmkanları. Tarım Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, No: 102.
- Ertan, E. Kılınç S. S., 2005. Seleksiyon ile belirlenmiş kestane genotiplerinin morfolojik, fenolojik ve biyokimyasal özellikleri. **ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi** 2005; 2(2): 67-77.
- Ertan, E, Seferoğlu, G. Da1kılıç G.G., Tekintaş, F.E., Seferoğlu, S., Babaeren F., Onal, M., Da1kılıç, Z., 2007. Selection of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) grown in nazilli district, Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forest**, 31: 115-123 TUBİTAK.
- Ertürk Ü. 2000. Sert kabuklu meyve türlerinin doku kültürü ile üretim olanakları. **II. Ulusal Fidancılık Sempozyumu**, (52-29 Eylül), Bademli- Ödemiş.
- Giovannelli, A., Giannini, R. 1999. Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut. **Acta Horticulturae**, 494: 243-246.
- Gonçalves, J.C, Diogo, G, Amancio, S, 1998. Invitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **Scienta Horticulture** 72: 265-275.

- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Tzoulis, T., Eleftheriou, E.P. 2005. Experimental use of a novel temporary immersion system for liquid culture of olive microshoots.(Huaslef-Eide, A.K., Preil, w.,Eds.) In, Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, **Springer**, publishers, pp. 263-274
- Hepaksoy S., 2004. Bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerinde araştırmalar I. gelişme ve çoğalma. **Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi**, 41 (3):11-22
- Hisajima, S., Ishizuka, K., Paek, K.Y., Namwongprom, K., Subhadrabandhu, S. 1989. Multiple shoot induction from seeds of Japanese chestnut (*Castanea crenata Sieb. et Zucc*) and successive shoot multiplication in vitro. **Kasetsart J. Nat. Sci.**, 23: 267–272.
- Mato, M. Cl., ve Vieitez, A. M., 1986. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. **Physiologia Plantarum**, 66(3):491-494
- Merkle, S.A., Wiecko, A.T., Watson-Pauley, B.A., 1991. Somatic embryogenesis in American chestnut. **Canada Journal Forest Research**, 21: 1698-1701.
- Mert, C., Soylu, A. 2009. Shoot apex of dormant buds in chestnut. **Acta Horticulturae** 844.sayfa aralığı
- Nas, M.N., Read, P.E., Miller, V., Rutter, P.A. 2003. In vitro ‘rejuvenation’ of woody species is temporary. **Acta Horticulturae**, 625: 211-215.
- Osterc, G., Fras, M.Z., Vodenik, T., Luthar, Z., 2005. The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. **Acta agriculturae, Slovenica**, 85(2): 411-418.
- Özden, Y., Özüdođru, E.A., Kaya, E., Akdemir, H., 2010. Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinin geçiçi daldırma biyoreaktör sistemleri (TIS) ile *in vitro* sürgün çoğaltımının iyileştirilmesi. **Zeytin Bilimi**, 1(1): 1-6.
- Piagnani, C. Eccher, T., 1988. Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut in vitro. **Acta Horticulturae**, 227: 384-386.

- Preil, W., 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. **Springer**, 1-18.
- Raghuvanshi, S.S., Srivastava, A., 1995. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 41:83-85.
- Roschke, C., Pijut, P.M., 2007. Micropropagation of *Juglans nigra* L. in Liquid Culture. Purdue University, Dept. of Forestry and Natural Resources, Hardwood Tree Improvement and Regeneration Center (HTIRC). USDA Forest Service, Northern Research Station.
- Rowe, Jan W., 1986. New technologies in plant tissue culture: Tissue Culture as a Plant Production System For Horticultural Crops, (Zimmermann R.H., Eds.). Martinus Nijhoff Publishers. p. 35-53. Dordrecht. The Netherlands
- San Jose, M.C., Vieitez, A.M., Vieitez, E., 1984. *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 59(3): 359-365.
- San Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 2001. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. **Journal of Horticulture Science and Biology**, 76(5): 588-595.
- Sanchez, M.C., Vieitez, A.M., 1991. In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. **Tree Physiology**, Heron Publishing-Victoria, 8: 59-70. Canada.
- Sanchez, M.C., San Jose, M.C., Ferro, E., Ballester, A., Vieitez, A.M., 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. **Journal of Horticulture Science**, 72: 433-443.
- Serres, R., Read, P., Hackett, W., Nissen, P., 1990. Rooting of American chestnut microcuttings. **Journal of Environment Horticulture** 8(2): 86-88.
- Sezgin, M., Dumanoglu, H., 2009. Fagaceae familyasında *in vitro* tekniklerin kullanımı ve son gelişmeler. **Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi** A(2): 147-159

- Soylu, A. Ertürk, Ü., 1998. Researches on micropropagation of chestnut. Proceedings of the Second International Chestnut Symposium, 19-23 October 1998. Bordeaux, France. **Acta Horticulturae**, 494: 247-253.
- Soylu, A. Ufuk,S. 1994. Marmara Bölgesi kestanelerinin seleksiyon yoluyla Islahı. Sonuç Raporu, Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Soylu, A., 1984. Kestane Yetiştiriciliği ve Özellikleri. Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 59, Yalova.
- Soylu, A., 2004. Kestane Yetiştiriciliği ve Özellikleri (Genişletilmiş II. Baskı). HASAD Yayıncılık, 64, İstanbul.
- Şan, B., Sezgin, M., Dumanoğlu, H., Köksal, A.İ., 2007. Somatic embriyogenesis from immature cotyledons of some european chestnut (*Castanea sativa* Mill) cultivars. **Turk Journal of Agriculture and Forest**, 31: 175-179
- Takayama, S., Misawa, M., 1981. Mass propagation of begonia x hiemalis plantlets by shake culture. **Plant Cell Pysiol.** 22: 461-467.
- Takayama, S., Akita M., 2008. Bioengineering aspects of bioreactor applications in plant propagation. plant tissue culture engineering, Springer, pp. 83-100.
- Takayama, S., Akita, M., 2005 . Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation. **Springer**, 61-78.
- Tetsumura, T., Yamashita, K. 2004. Micropropagation of Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) seedlings. **HortScience.**, 39(7): 1684-1687.
- Tewary, P.K., Oka, S., 1999. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 59: 223-226.
- Vieitez A. M., Veitez, M. L., Veitez, E. 1986. Chestnut spp. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees 1Bajaj, Y.P.S. Ed, Springer pp: 393-414Verlag, Berlin.

- Vieitez, A.M., Sanchez, M.L., Garcia-Nimo M.L. Ballaster, A., 2007. Protocol for micropropagation of *Castanea Sativa*. In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees And Fruits* (Editürles). **Springer**, pp.299-312,
- Vieitez, F.J., San Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 1990. Somatic embriyogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. **Journal Plant Physiology.**, 136: 253-256.
- Xing, Z., Powell, W.A, Maynard, C.A, 1999. Development and germination of American chestnut somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 57: 47-55.
- Xing, Z., Satchwell, M.F., Powell, W.A., Maynard, C.A. 1997. Micropropagation of American Chestnut: Increasing Rooting Rate and Preventing Shoot-Tip Necrosis. **In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 33:43-48.
- Yang, G., Kamp-Glass M. Read., P., 1999. Enhancing rooting of in vitro-propagated chestnut shoots. **HortScience**, 34(3): 460.
- Yang, G., Zhongge L., Asante, T.M., Read, P.E., 2009. In vitro responses of American chestnut to plant growth regulators in culture medium. **Acta Horticulturae**, 844: 229-234.
- Zhu, L.H., Li, X.Y., Welander, M., 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, **Springer**, pp.253-261.
- Zimmerman, R.H., 1991. Micropropagation of temparete zone fruit an nutcrops. micropropagation (Debergh P.C, Debergh, P.C., Zimmerman R.H. Eds.). In: *Micropropagation: Technology and Application*, Kluwer Academic Publishers, pp. 231-246.
- Ziv M., 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. **Horticultural Reviews**. 24:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burak Erdem Algül

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir / 31.03.1984

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Ulusal Bildiriler : İncir Fidanı Üretim Organizasyonu. Engin ERTAN,
Gülsüm KARAKAYA, Burak Erdem ALGÜL,
Birgül ERTAN, Öznur KILINÇ, Melih AYDINLI.
Türkiye 6. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi 04-08
Ekim 2011 Şanlıurfa Poster Bildirimi.

Fıstıkçamı Kotiledonlarında In vitro Adventif
Tomurcuk Oluşumu Üzerine Bakır ve Thiaminin
etkisi. Gonca GÜNVER DALKILIÇ, Burak Erdem
ALGÜL, Zeynel DALKILIÇ Türkiye 6. Ulusal
Bahçe Bitkileri Kongresi 04-08 Ekim 2011
Şanlıurfa Poster Bildirimi.

‘Burkett’ Pikan Tohumlarının Çimlenme Hızına
GA3 ve ASA’nın Etkisi. Gülsüm KARAKAYA,
Burak Erdem ALGÜL, Gökhan ORUÇ, Melih

AYDINLI, Zeynel DALKILIÇ Türkiye 6. Ulusal
Bahçe Bitkileri Kongresi 04-08 Ekim 2011
Şanlıurfa Poster Bildirimi.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Bölümü / 2010-2012

İLETİŞİM

E-posta Adresi : burakerdem@adu.edu.tr

Tarih :10.08.2012