

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
ZBB – YL – 2008 – 0002

FISTIKÇAMI (*Pinus pinea* L.)' NİN SOMATİK
EMBRYOGENESİS VE TOMURCUK KÜLTÜRÜ
YOLUYLA
in vitro ÇOĞALTIMI

Tuğrul TOMBA

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ

AYDIN - 2007

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Tuğrul Tomba tarafından hazırlanan “Fıstıkçamının (Pinus pinea L.) Somatik Embriyogenesis ve Tomurcuk Kültürü Yoluyla in vitro Çoğaltımı” başlıklı tez, 30/11/ 2007 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. Gonca Günver–Dalkılıç	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Doç. Dr. Olcay Arabacı	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Zeynel Dalkılıç	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun.....sayılı kararıyla/...../ 2007 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Tuğrul Tomba

İmza :

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

FISTIKÇAMI (*Pinus pinea* L.)'NİN SOMATİK EMBRİYOGESİS ve
TOMURCUK KÜLTÜRÜ YOLUYLA IN VITRO ÇOĞALTIMI

Tuğrul TOMBA

Adnan Menderes Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü laboratuvarında, 2005–2007 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmada, fıstıkçamı (*Pinus pinea* L.)'nin klonal yolla ve hızlı bir şekilde üretilebilmesi için, somatik embriyogenesis ve tomurcuk kültürü teknikleri uygulanmıştır. Somatik embriyogenesis denemeleri için olgun tohumlardan çıkarılan embriyoların kotiledonları kullanılmıştır. Kotiledonlar üç farklı büyüme düzenleyicisini üç seviyeli içeren DCR, değiştirilmiş LP ve değiştirilmiş 1214 besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kotiledon eksplantları üzerinde beyaz, saydam renkte ve sulu yapıda kallus dokusu oluşmuş, fakat somatik embriyo oluşumu elde edilememiştir. Tomurcuk kültürü denemelerinde kullanmak için bir yıllık sürgünlerin uç ve uca yakın kısımları yaklaşık 5–8 mm'lik segmentler şeklinde kesilmiştir. Sürgün segmentleri, büyüme düzenleyicilerinin 7 farklı seviyesini içeren ½ DCR besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bazı sürgün segmentlerinde tomurcuk kabarması ve iğne yaprak çıkışı gözlenmiştir.

2007, 38 sayfa

Anahtar Sözcükler

in vitro, somatik embriyogenesis, tomurcuk kültürü, *Pinus pinea* .

ABSTRACT

MSc. Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF STONE PINE THROUGH SOMATIC
EMBRYOGENESIS AND BUD CULTURE

Tuğrul TOMBA

Adnan Menderes University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gonca GÜNVER DALKILIÇ

This study was carried out at Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Tissue Culture Laboratory between 2005 – 2007. In the study, somatic embryogenesis and bud culture techniques were used to be propagated of stone pine (*Pinus pinea* L.) clonally and rapidly. Cotyledons of embryos excised from mature seeds were used for somatic embryogenesis trials. The cotyledons were cultured on three different media DCR, modified LP and modified 1214, contain three levels of three growth regulators. White and transparent callus masses were formed on cotyledon explants. But somatic embryos were not achieved. The shoot-tip of the one year old shoot are cut into 5-8 mm of segments approximately. Shoot segments were cultured on ½ DCR medium that contains seven different levels of growth regulators. Bud swelling and needle leaves protruding were seen on some of the segments

2007, 38 pages

Key Words

In vitro, somatic embryogenesis, bud culture, *Pinus pinea* .

ÖNSÖZ

Bu çalışmada yardımını ve desteğini hiç esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç Dr. Gonca Günver.Dalkılıç'a, lisansüstü tez denemesine yaptığı maddi katkısı için Koçarlı Kaymakamı Sayın Mustafa Özarslan'a, Koçarlı Belediye Başkanı Sayın Cengiz Şen'a ve Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Projeleri Araştırma Fonu'na, denemelerde ihtiyacımız olan bazı kimyasal maddeleri sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Bengi Erdağ'a, yardımlarından ve desteklerinden dolayı Bahçe Bitkileri Bölümü tüm personeline, istatistiki analizler için Yrd. Doç. Dr. Zeynel Dalkılıç'a, Ziraat Fakültesi öğrencileri İlknur Kavas ve Cihat Lalaşahin'e, Urla Ormancılık Araştırma Enstitüsü'nden Ziraat Mühendisi Zeynep Gülçin Altun'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bütün eğitim hayatım boyunca ve özellikle lisansüstü eğitim süresince maddi ve manevi desteklerini daima hissettiğim AİLEME saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Somatik embriyogenesis denemesi.....	16
3.1.2. Tomurcuk kültürü denemesi.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması.....	17
3.2.1.1. Somatik embriyogenesis denemesi.....	17
3.2.1.2. Tomurcuk kültürü denemesi.....	18
3.2.2. Tohumların ve sürgün parçalarının sterilizasyonu.....	19
3.2.2.1. Somatik embriyogenesis denemesi.....	19
3.2.2.2. Tomurcuk kültürü denemesi.....	20

3.2.3. Dikimi yapılacak parçaların hazırlanması ve dikimi.....	20
3.2.3.1. Somatik embriyogenesis denemesi.....	20
3.2.3.2. Tomurcuk kültürü denemesi.....	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. Somatik Embriyogenesis Denemesi.....	23
4.2. Tomurcuk Kültürü Denemesi.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	38

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

μM	Mikromol
$\frac{1}{2}$ LP	Yarı seyreltik ‘Querin and Le Poivre’ besin ortamı
$\frac{1}{2}$ MS	Yarı seyreltik ‘Murashige and Skoog’ besin ortamı
2,4- D	2,4- diklorofenoksi asetik asit
8-Br-cGMP	Guanosin 3’,5’-siklik monofosfat, 8-brom-, sodyum tuzu
ABA	Absizik asit
BA veya BAP	6-benziladenin veya Benzilaminopürin
DCR	‘Douglas fir Cotyledon Revised’ besin ortamı
GA ₃	Gibberellik asit
GD	‘Gershoff and Doy’ besin ortamı
ha	Hektar
IBA	İndol bütirik asit
MES	2 (n-morfolin) etan sulfonic asit
NAA	Naftalen asetik asit
PEG	Polietilen glikol
SH	‘Schenk and Hildebrandt’ besin ortamı
TDZ	Thidiazuron
WPM	‘Woody Plant Medium’ besin ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa No:
Şekil 3.1 Denemelerde kullanılan fıstıkçamı tohumları.....	16
Şekil 3.2 Denemelerde kullanılan sürgünler.....	17
Şekil 3.3 Denemelerde kullanılacak eksplantların sterilizasyon aşamaları.....	20
Şekil 3.4 Başlangıç ortamına yerleştirilen embriyolar.....	21
Şekil 4.1 Embriyo çoğaltma ortamında, 1214-1 ortamından gelen kalluslu kotiledonların görünüşü.....	25
Şekil 4.2 Embriyo çoğaltma ortamında, 1214-3 ortamından gelen kalluslu kotiledonların görünüşü.....	26
Şekil 4.3 Besin ortamına yerleştirilmiş sürgün segmentlerinin görünüşü.....	27
Şekil 4.4 Sürgün segmentleri üzerindeki tomurcuk kabarması.....	28
Şekil 4.5 Sürgün segmentleri üzerindeki iğne yaprak çıkışı.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:

Sayfa No:

Çizelge 1.1 Muğla Orman Bölge Müdürlüğü fıstıkçamı alanları.....	1
Çizelge 1.2 Ülkeler ve bölgeler bazında Dünya çam fıstığı üretimi	4
Çizelge 1.3 Ülkemizin yıllık toplam çam fıstığı dışsatımı ve geliri	5
Çizelge 3.1 Denemelerde kullanılan değiştirilmiş besin ortamlarının içerikleri.....	19
Çizelge 4.1 Somatik embriyo başlangıç ortamlarında kotiledonlar üzerinde kalluslanma durumu.....	23
Çizelge 4.2 Besin ortamları ve büyüme düzenleyicileri seviyelerinin kalluslanma üzerine etkisi (A X B interaksiyonu).....	24
Çizelge 4.3 Somatik embriyo çoğaltma ortamına aktarılan kalluslu eksplantlarda gelişme durumu.....	25
Çizelge 4.4 Sürgün segmentlerinde kültürün 6. haftasındaki gelişme.....	27

1. GİRİŞ

Bir orman ağacı olarak değerlendirilen fıstıkçamı (*Pinus pinea* L.), elde edilen ürün açısından son yıllarda sert kabuklu meyve türleri içerisinde de kabul edilmeye başlanmıştır. Fıstıkçamı Akdeniz, Ege ve Marmara’da doğal meşcereler halinde bulunurken, diğer bölgelerde de yetiştirilebilmektedir (Genç, 2004a). Akdeniz ikliminin doğal bitki türü olup, iklim isteği genel olarak ılıman karakterli deniz iklimidir. Işık ve sıcaklık isteği fazla olan bir ağaç türüdür.

Ülkemizde özellikle Ege Bölgesi’ndeki orman köylülerinin en önemli geçim kaynaklarından birini bu türün meyvesi olan ve halk arasında künar, fıstık vb. adlarla anılan çam fıstığı oluşturmaktadır. Ülkemizde toplam fıstıkçamı alanı 123.266,2 hektardır (Anonim, 2004). Ege Bölgesi ülkemizde en fazla fıstıkçamı alanına sahip bölgemizdir. Burada en fazla alana sahip yöre ise İzmir – Bergama’daki Kozak yöresidir (Genç, 2004a). Kozak yöresinin sahip olduğu toplam fıstıkçamı alanı 16.000 hektardır (Çetin, 2003). Kozak yöresinden sonra bölgemizde en fazla fıstıkçamı alanına sahip olan yer ise içinde bulunduğumuz Aydın- Koçarlı yöresidir. Muğla Orman Bölge Müdürlüğü kayıtlarına göre, Koçarlı yöresi fıstıkçamı alanları toplamı 8.878 hektardır (Çizelge 1.1). Bu rakam, Muğla Orman Bölge Müdürlüğü sorumluluk sahasının yaklaşık %36,82’sidir.

Çizelge 1.1: Muğla Orman Bölge Müdürlüğü Fıstıkçamı Alanları

Yörelere	Alan (ha)	Alan (%)
Koçarlı	8.878	36,82
Söke	4.573	18,97
Bozdoğan	932	3,87
Karpuzlu	578	2,40
Milas	6.727	27,90
Yatağan	2.423	10,05
Toplam	24.111	100,00

Kaynak: Muğla Orman Bölge Müdürlüğü kayıtları

Ülkemizde doğal olarak yetişen beş çam (karaçam “*Pinus nigra*”, sarıçam “*Pinus sylvestris*”, kızılçam “*Pinus brutia*”, fıstıkçamı “*Pinus pinea*” ve Halep çamı “*Pinus halepensis*”) türünden birisi olan ve diğerlerinin aksine işletme amacı yönünden

farklı bir şekilde yetiştirilen fıstıkçamı tüm Akdeniz havzasındaki ülkeler (İspanya, İtalya, Portekiz vd.) gibi, ülkemiz açısından da o kadar önemlidir. Fıstıkçamının hem ülke ekonomisine hem de yöre halkına sağladığı faydalar tartışılmaz bir hal almıştır (Kırdar, 1998).

Fıstıkçamı, Pinaceae familyasının Pinus cinsine ait (alt cinslerle birlikte) yaklaşık 110–120 türünden biridir (Anonymous, 2007a). Fıstıkçamının bilimsel sınıflandırması aşağıda listelenmiştir. (Anonim, 2007a)

Alem	: Plantae
Bölüm	: Pinophyta
Sınıf	: Pinopsida
Takım	: Pinales
Familiya	: Pinaceae – Çamgiller
Cins	: Pinus
Tür	: Pinus pinea L.

Fıstıkçamı (*Pinus pinea* L.), orta boylu, 20–25 m boylara ulaşan, öteki çamlardan kolayca ayrılan, yaşlanınca şemsiye gibi dağılan bir tepe yapısı olan çam türüdür. Bu nedenle birçok yayında şemsiye çamı da denilmektedir. Gövde önce puslu yapıda olup, kahverengi kırmızı, sonra derin çatlaklı ve büyük plakalar halinde kalın bir kabuğa sahiptir. Genç sürgünler incedir. Bunlar önceleri koyu yeşil sonraları sarımsak kahverengidir. Reçinesiz tomurcuklar yumurta şeklinde ve sivridir. Tomurcuk pullarının uçları geriye doğru kıvrılmıştır. İğne yapraklar 10-20 cm uzunluğunda, parlak, batıcı ve sivri uçlu, kenarları dişli olup, açık yeşil renktedir. İğne yaprakların dip kısımlarını örten kın oldukça uzun (10–12 mm), açık sarı, esmer renktedir. Oysa kın ve iğne yaprakları fıstıkçamına benzeyen *Pinus pinaster* L.'de, kın daha uzun, rengi ise siyahtır (Kurt, 2000).

Erkek çiçekler silindirik biçimde olup, uzundur. Terminal durumlu dişi çiçek, teker teker, bazen de, 2–3 adedi bir arada bulunur. Kozalak çok kısa saplı, sürgüne hemen hemen oturmuş gibidir. Olgunlaşmasını üç yılda tamamlamakta, rengi parlak, kırmızımsı kestane rengindedir. Oval ve simetrik bir biçimde olan kozalağın pulları parlak kahverengidir. Odunsu ve kalın olan apofizin 5–6 adet radyal pervazı bulunur. Kozalağın dip taraflarında bulunan pullar, 6 köşeli olup, uçlarına doğru olanlar ise eşkenar dörtgen (kare) biçimindedir. Gri beyaz renkteki göbek, büyük, basık ve hemen hemen dört köşelidir (Kurt, 2000).

Tohum diğ er ç am türlerinden çok de ğ iş ik olup, 1,5–2,0 cm büyüklü ğ undedir. İ ri kanat çok ince kalmış , yani körelmiş tir. İ nteğ ümentin dış kısmı sanki çekirdek ya da taş gibi sertleş miş ve odunlaş mış tir. Fideciğ in ç enek sayısı 10–13 adettir. Fıstıkç amının kök sistemi genellikle kuvvetlidir. Uygun topraklarda daha ilk yıllarda baş layarak derine inen kazık kök oluş turur. Bu nedenle deniz rüz gârlarına karş ı derin kökleri ve geniş tepeleri ile önemli ölçüde karş ı koymaktadır. Odununun geniş , belirgin olarak ayrılan kırmızımtrak kahverengi öz odunu vardır. Bu ç am türünün odunu, her ne kadar sarıç am ve karaç am kadar de ğ ilse de kimi yerel gereksinimlerde reç ine üretimi için de kullanılmaktadır. Asıl yararlanma ř ekli ise yenen ya ğ lı tohumları olan yan ürünleridir. Aynı zamanda güzel bir park ağ acıdır. Özellikle Akdeniz yörelerinde kurak ve sıcak yazlara çok iyi uyum sa ğ lamaktadır (Kurt, 2000).

Fıstıkç amı dış ında Pinus cinsine ait yaklaşık 20 tür yenilebilir tohum üretmektedir. Bu yirmi türden, Pinus sibirica, Pinus koraiensis, Pinus gerardiana, ve Pinus monophylla ekonomik öneme sahip olup Çin, Rusya, Orta Asya ülkeleri ve Amerika kıtasında yetiş tirilmektedir (Anonymous, 2007b). Ç am fıstı ğ ı bu türün ana ürünüdür. 13–15 yaş ında ç amlar üzerinde olgunlaş mış kozalaklar görölürse de ekonomik verime 20–25 yaş ında ulaş ırlar ve bu verim 100 yaş ına kadar sürer. Kozalaklar üç senede olgunlaş ır. Ağ açlar yaş landı ğ ı zaman ř emsiye görünümü alan bir taç yapısına sahiptir. Bu görünüm ış ık iste ğ inin fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Genç, 2004b).

Fıstıkç amı kızılç amla birlikte ılıman iklime ve deniz kenarlarına ba ğ lı bir türdür. Hatta kızılç ama nazaran daha fazla ılıman iklim iste ğ inde olup, kontinental (karasal) iklimlerden kaç ınır. Kızılç am gibi, sıcaklı ğ a ve kuraklı ğ a büyük ölçüde dayanır (Kırdar, 1998).

Dünya üzerinde çok fazla yayılmamış olan fıstıkç amı, özellikle Akdeniz ülkelerinde yayılmış durumdadır. Fıstıkç amı Dünya üzerinde 380.000 ha alana sahiptir (Genç, 2004a).

Genç (2004a)'e göre: “Ülkemizde Bergama – Kozak Yaylası'nda ve Aydın – Mazon yöresinde büyük meş cereler kuran fıstıkç amı, Karadeniz Bölgesi'nde Trabzon – Kalenima Vadisi'nde, Bartın – Ç akraz'da ve Artvin – Ç oruh Vadisi'nde bulunur. Marmara Bölgesi'ndeki yayılış ı ise Marmara, Gemlik, Kumla, Armutlu ve

Çanakkale yörelerindedir. Ege Bölgesi'nde deniz iklimine açık yetişme ortamları ile deniz ikliminin etkili olduğu kıydan uzak havzalarda (Torbalı, Bergama, Menderes, Gördes, Yatağan, Koçarlı gibi) görülen fıstıkçamı; Akdeniz Bölgesi'nde Antalya, Kahramanmaraş ve Hatay illerinin mülki sınırları içinde, izole olmuş yayılışlara sahiptir.”

Dünya yenilebilir çam fıstığı ortalama üretimi yaklaşık 20,000 ton/yıl düzeyindedir. Bunun 8,000 tonu Çin tarafından üretilmektedir. Ülkemizin bundaki payı ise 1.200 – 1.300 ton/yıl civarındadır. Bu rakamın da yaklaşık 900 tonu Bergama – Kozak'ta, kalanı ise Aydın – Koçarlı'da ve Muğla'da üretilmektedir. (Nergiz ve Dönmez, 2004).

T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Arge Başkanlığı tarafından hazırlanan bir yayına göre, Dünya çam fıstığı üretimi ülkeler ve yıllar bazında Çizelge 1.2'de görülmektedir (Özden, 2007).

Çizelge 1.2: Ülkeler ve Bölgeler Bazında Dünya Çam Fıstığı Üretimi (Özden, 2007)

ÜRETİCİ ÜLKELER	2000 (ton)	2001 (ton)	2002 (ton)	2003 (ton)	2004 (ton)	2005 (ton)	2006 (ton)
Asya	3.000	8.475	8.150	25.820	16.175	9.060	3.000
Çin	3.000	4.750	2.500	23.500	5.025	4.000	3.000
Rusya	0	8.360	5.000	5.100	6.250	3.080	0
Moğolistan	0	225	150	320	150	1.500	0
K.Kore	0	1.500	500	2.000	1.000	560	0
Afganistan-Pakistan	0	2.000	5.000	0	10.000	3.000	0
Avrupa	4.450	11.260	6.815	8.560	11.800	5.985	2.905
İspanya	1.800	700	485	1.000	3.000	980	980
Portekiz	1.000	750	330	1.050	850	875	875
İtalya	950	900	1.000	560	400	700	700
Türkiye	700	550	0	850	1.300	350	350
Toplam	7.450	19.735	14.965	34.380	27.975	15.045	5.905

Ülkemizin çam fıstığı dışsatımı geliri Ege İhracatçı Birlikleri'nin elektronik ortam kaynaklarına göre yıllık ortalama 16,25 milyon ABD \$ düzeyindedir. 2007 yılına ait rakamlar, 01.01.2007 ile 31.10.2007 tarihleri arasını kapsamaktadır (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.3: Ülkemizin yıllık toplam çam fıstığı dışsatımı ve geliri

	2004	2005	2006	2007
Miktar (kg)	845.790	578.069	608.450	1.014.784
Tutar(ABD \$)	15.207.678	10.654.328	14.428.933	26.041.821

Kaynak: Anonim, 2007b

Ülkemizde fıstıkçamı ormanları tohumdan oluşmuştur. Bu nedenle ağaçlar geç tohum verimine başlamakta ve ıslah edilmiş üstün genotipler kullanılmadığı için tohum verimi de İspanya, Portekiz ve İtalya gibi ülkelere göre oldukça düşük olmaktadır. Avrupa’da yıllık ortalama çam fıstığı üretimi 500 kg/ha düzeyindeyken, ülkemizde ise Kahramanmaraş–Hartlap Orman İşletme Şefliği sahasında kozalak üretimi 229 kg/ha olarak tahmin edilmiştir (Genç, 2004a). Tohum verimi yüksek ağaçlardan (20–25 yaşlı) aşı, çelik, in vitro kültür gibi vegetatif yollarla fidan üretimi yapılabilirse genç yaşlarda kozalak ve çam fıstığı üretimi yapmak mümkün olacaktır.

Bu çalışmada orman ağaçlarının hızlı ve klonal yolla çoğaltımında önemli bir potansiyele sahip somatik embriyogenesis tekniği ve tomurcuk kültürünün fıstıkçamının hızlı çoğaltımında optimizasyonu amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Orman ağaçlarının in vitro kültür yoluyla üretilmesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Bazı orman ağaçlarının dokuları, yaşlı fertlerden alınmış ise, çok zor köklenmektedir. Bu nedenle araştırmalarda genç bitkilerin embriyo, hipokotil, sürgün uçları veya tomurcuk eksplantları gibi doku parçaları kullanılmaktadır.

Fıstıkçamının in vitro şartlarda üretilmesine yönelik çalışmış araştırmacılarından, Gonzales et al. (1998), fıstıkçamı kotiledonlarının adventif tomurcuklarından, bitki rejenerasyonunun 4,5 µM BA (benziladenin) içeren yarı seyreltik Le Poivre ortamında sağlandığını bildirmiştir.

Garcia-Férriz et al. (1994), değiştirilmiş MS, SH ve GD ortamlarında BA (benziladenin)'nin 5, 25, 50 µM dozlarının çamda organogenik tepki üzerine olumlu etki yaptığını belirtmişlerdir.

Sul and Kobran (2004) farklı tuz konsantrasyonları, karbon kaynakları, oksin ve sitokininin fıstıkçamı kotiledonlarında sürgün organogenesisine etkilerini açıkladıkları çalışmalarında, sakkaroz ve 30 µM BA içeren ½ MS ortamında en iyi sonucu almışlar, sürgünler aktif karbon içeren ve büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda uzama göstermişlerdir.

Valdes et al. (2001) ise, fıstıkçamının çimlenmiş embriyolarından izole edilerek in vitro kültüre alınan kotiledonların, 4,4 µM BA uygulamasına sürgün organogenesisi tepkisi verdiğini bildirmektedirler.

Pullman et al. (2004), Pinus taeda'da somatik embriyogenesis başlangıcının, değiştirilmiş ½ P6 tuzları konsantrasyonu, 50 mg/L aktif karbon, aktif karbonun adsorbsiyonunu desteklemek için ayarlayıcı Cu ve Zn, % 1,5 maltoz, % 2 myo-inositol, 500 mg/L casamino asit, 450 mg/L glutamine, 2 mg/L NAA, 0,63 mg/L BAP, 0,61 mg/L kinetin, 3,4 mg/L gümüş nitrat, 10 µM 8-Br-CGMP, 0,1 µM brassinolide ve 2 g/L gelrite içeren temel ortama 0,05 mg/L biotin, 0,5 mg/L folik asit ve 250 mg/L pH tampon ajanı MES ilave edildiğinde geliştirildiğini açıklamışlardır.

Yine Pullman et al. (2004), *Pinus taeda*, *Pinus elliotti*, *Pseudotsuga menziesii* ve *Picea abies* adlı ibreli türlerde yaptıkları araştırmada ise somatik embriyogenesinin başlatılmasının, paclobutrazol'un ortama farklı dozlarda ilavesiyle mümkün olduğunu bildirmektedirler.

Tang and Guo (2000), *Pinus taeda*'nın 8 genotipinin olgun zigotik embriyolarını 2,4-D ya da NAA, BA ve kinetin içeren teşvik ortamında 2–3 hafta kültüre alıp sonra farklılaşma ortamına aktarmışlar daha sonra da 1 mg/L BA, 0,5 mg/L GA₃, 0,5 mg/L IBA ilave edilen TE ortamında köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Schestibratov et al. (2002), çimlenmenin erken safhalarında (radisil 2-5mm.) tohumlardan kesilip çıkarılan embriyogenik eksplantlardan nodular kallus dokusu çoğalmasında, 2,85 µM IBA ve 22,2 µM BAP' la desteklenmiş ve potasyum nitrat konsantrasyonunu 500 ml'ye düşürme şeklinde değiştirilmiş ½ Le Poivre ortamının en iyi sonucu verdiğini; ayrıca adventif tomurcuk oluşumunun %2 sakkaroz ve 0,44 µM BAP içeren ½ LP temel ortamında gerçekleştiğini ve sonraki 6 hafta boyunca aynı ortamda sürgünlerin tomurcuklardan uzadığını bildirmektedirler. Yine aynı araştırmada, uzayan sürgünler sırasıyla 2,69 µM, 4,93 µM ve 0,11 µM NAA, IBA ve BAP kombinasyonu, %2 sakkaroz, 0,4 mg/L thiamine- HCl, 1000 mg/L myo-inositol, SH ortamının makro ve mikro tuzlarından oluşan kök başlatma ortamında (RIM 21) 10 gün tutulduktan sonra %1 sakkaroz içeren, büyüme düzenleyicisiz yarı seyreltik SH ortamına kök uzaması için transfer edildiklerinde en iyi köklenme sonucunu verdiğini belirtmektedirler.

Malabadi and Hiranjit (2002), *Pinus kesiya*'da olgun zigotik embriyoların, 8,87 µM BA, 26,85 µM NAA ve 22,62 µM 2,4-D ilave edilmiş 4 g/L gellan gum ve 30 g/L maltoz içeren yarı seyreltik değiştirilmiş MS ortamında kültüre alındığında proembriyonal kütleli, beyaz, yarı geçirgen ve cıvık embriyogenik kallus ürettiğini bildirmektedirler.

Yine aynı çalışmada, üstte açıklanan embriyogenik kallusların yarı seyreltik MS ortamında (60g/L maltoz ve 4g/L gellan gum içeriyor, 2,262 µM 2,4-D, 2,685 µM NAA, 0,887 µM BA ilave edilmiş) yapılan alt kültürünün, erken safha kotiledonal embriyoların başlatılmasıyla sonuçlandığı açıklanmaktadır. İlave üç haftadan sonra ise 60g/L maltoz, 10 g/L gellan gum 37,84 µM ABA ve 0,2 g/L aktif karbonlu

ortamda embriyogenik kallus kültürünün, kotiledonal embriyo ürettiğini ve tam bitkiciklerin ise sözü edilen somatik embriyolardan ayrılıp büyüme düzenleyicisiz, 4 g/L gellan gum ile kuvvetlendirilmiş yarı seyreltik ortamında kültüre alındığında elde edildiğini ifade etmektedirler.

Pinus kesiya'da yürütülmüş bir araştırmada, embriyogenik kültürler, değiştirilmiş MS ortamında kültüre alınmış olgun zigotik embriyolardan yüksek bir frekansta başlatılmış ve proembriyonal kütlelerin aynı ortamda fakat büyüme düzenleyicilerinin 1/10 konsantrasyonunda, alt kültürü ile 3 haftada geliştiği belirtilmektedir. Ayrıca proembriyonal kütleler, ABA (15,12 μM) ve sakkaroz (40 gr/L) içeren temel ortamda 4–5 hafta kültüre alındığında kotiledonal embriyolar üretmişlerdir. Bu kotiledonal embriyolar myo-inositol (1000 mg/L), sakkaroz (30 g/L) ve aktif karbon (2 g/L) içeren fakat casein hidrolisate ve L-glutamineden yoksun ortamda 12 saatlik fotoperiyotta 3–4 haftada uzamışlardır. Uzayan bu kotiledonal embriyolardan 3–4 haftada sakkaroz (30 g/L) içeren değiştirilmiş MS ortamında fide elde edildiği bildirilmektedir (Deb and Tandon, 2002).

Lelu et al. (1999) Pinus pinaster ve Pinus sylvestris'te büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ya da bulunmadığı ortamlarda, somatik embriyo gelişimi ve bitkicik rejenerasyonunu araştırdıkları çalışmalarında; zigotik embriyoları önce 2,4-D'li ya da 2,4-D'siz ve BA'lı ve BA'sız değiştirilmiş Litvay ortamında (LM) kültüre almışlar ve ardından ABA'lı ya da ABA'sız ve gellan gum'lu ve gellan gum'suz LM'na aktarmışlardır. Somatik embriyogenesis her iki ortamda da başlatılmış ve sürdürülmüştür. Pinus sylvestris'de kültür ortamının embriyogenik kültürlerin başlatılması ve çoğaltılmasında önemli bir etkiye sahip olmadığını, Pinus pinaster'da ise en iyi tepkinin büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ortamda, kotiledon primordialarının uzamasından önceki safhada kesip çıkarılan zigotik embriyolarla elde edildiği belirtilmektedir.

Pinus elliotti'de somatik embriyogenesis yoluyla bitkicik rejenerasyonunun açıklandığı bir çalışmada, embriyogenik kallus, 4 mg/L BA ve 1 mg/L 2,4-D içeren Le Poivre (LP) ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış zigotik embriyolarda başlatılmış ve 1 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L BA'lı LP ortamında çoğalması sağlanmıştır. Erken safha embriyoidleri, 4 mg/L ABA, 75 g/L polietilen glikol (PEG) ve 5 g/L aktif karbon ilaveli LP ortamında kotiledonal embriyoid olarak

geliştirilmiştir. Olgun somatik embriyolar hormonsuz ortamda çimlendirilmiş ve bitkicik haline getirilmiştir. Bitkiciklere dönüşen somatik embriyoların frekansı %15,6 olarak bulunmuştur (Tang et al., 1997).

Gaurav et al. (2000), *Pinus roxburghii*'de embriyogenik yığın çıkarımında, çoğunlukla konum, toplama tarihi, ortam bileşimi ve megagametofitin gelişim sürecine bağlı olarak değişim gözlemlenmişler ve üç embriyogenik hücre hattının, somatik embriyoların olgunlaşması ve bitkiye dönüştürülmesinde kullanıldığını bildirmektedirler.

Haggman et al. (1999), somatik embriyogenesinin başarılı olduğu durumlarda kullanılan zigotik embriyo eksplantlarının ya proembriyo ya da erken embriyolar olduğunu bildirmektedirler.

Pinus patula'da somatik embriyogenesinin araştırıldığı bir çalışmada embriyogenik kallusun, olgunlaşmamış zigotik embriyoları içeren *Pinus patula* megagametofitleri üzerinde başlatıldığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, embriyogenik doku, hem MS ortamında hem de DCR (Douglas fir Cotyledon Revised) ortamında kültüre alınan megagametofitlerde % 2,6 ortalamayla oluşmuş, en yüksek teşvik frekansı ise L-glutaminin temel azot kaynağı olarak kullanıldığı 3 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L BA eklenmiş DCR1 ortamında elde edilmiştir (Jones et al., 1993).

Diğer bir araştırmada ise *Pinus palustris*'in izole edilmiş zigotik embriyo ve zigotik embriyoları içeren dişi gametofitleri, glutamin içeren MS ortamında ya da DCR temel ortamında kültüre alınmıştır. Her iki ortamda, 4 farklı seviyede (% 1,5, 3, 6 ve 9) teker teker ortama ilave edilen üç farklı karbon kaynağı (glikoz, maltoz ve sakkaroz) ile desteklenmiş; ayrıca ortamlar BA ve 2,4-D'nin farklı seviyelerini de içermiştir. Dişi gametofitten kesip çıkarılan embriyogenik doku, dört hafta boyunca glikoz, sakkaroz ya da maltoz içeren ortamda kültüre alınmış, sonuç olarak embriyogenik doku başlatılmasının, dişi gametofitli zigotik embriyolar kotiledon öncesi safhadayken en sık oluştuğu bildirilmiştir (Nagmani et al., 1993).

Pinus strobus'un somatik embriyolarının olgunlaştırılması konusundaki bir başka çalışmada, prekotiledonal ve erken kotiledonal embriyolar içeren megagametofitlerin, başlatma ve embriyonal kütlelerin çoğalmasında, geç kotiledonal embriyoları içerenlerden daha başarılı olduğu açıklanmaktadır. Aynı

çalışmada, gellan gum'ın yüksek konsantrasyonunu içeren (%1) ortamın, 80 ya da 120 μM ABA'nın varlığında somatik embriyo gelişmesinde önemli bir ilerlemeye sebep olduğu belirtilmekte; ayrıca elde edilen ilk sonuçlarda, yüksek gellan gum'lı ortamda olgunlaşan embriyoların daha yüksek çimlenme frekansı gösterdikleri bildirilmektedir (Klimaszewska and Smith, 1997).

ABA ve KCl ile kombine edilmiş polietilen glikolün (PEG) *Pinus taeda*'da somatik embriyo gelişimine etkisinin incelendiği bir çalışmada, olgunlaştırma ortamı olarak kullanılan temel ortam, %0–10 PEG, 10–40 mg/L ABA, 0 ya da 10 μM KCl, 1,5 g/L aktif karbon, 30 g/L sakkaroz ve 6 g/L agarla desteklenmiştir. PEG'siz olgunlaşma ortamında, safha 1'deki somatik embriyolar daha fazla olgunlaşmamış, %5'den 7,5'e kadar PEG'li olgunlaşma ortamındaki embriyogenik dokular tutarlı bir şekilde safha 2 ve 3 somatik embriyoları üretmiştir. %7,5 PEG ve 10 μM KCl ile kombine edilmiş 40 mg/L ABA test edilen iki hücre hattında en yüksek sayıda safha 3 somatik embriyoları üretmiştir (Li Xin Huang and Gbur, 1997).

Garin et al. (2000), *Pinus strobus*'un beş embriyogenik hattının olgunlaşmasını, iki farklı gellan gum konsantrasyonu (%0,6 ve %1) ile katılaştırmış, çeşitli şekerler ve organik azot kaynaklı ortamda test etmişler ve % 1 gellan gum 88 μM sakkaroz ve 175 μM sorbitollü ortamın test edilen beş embriyogenik hattın dördünde en yüksek sayıda somatik embriyo ürettiğini bildirmişlerdir.

Pinus pinaster'in somatik embriyolarının olgunlaşmasına, karbon kaynakları, PEG ve gellan gum'ın etkisinin incelendiği bir araştırmada, PEG'nin ortama ilavesi, test edilen beş embriyonal suspensor yığın (ESM) hattından bir tanesinde olgunlaşmayı arttırırken, ESM çoğalmasını sınırlandırmıştır. Gellan gum'ın yüksek bir konsantrasyonda ortama ilavesi, beş ESM hattın olgunlaşmasını geliştirmiştir. Bütün ESM hatlarından kotiledonal embriyo kurtarmak için en etkili kültür ortamının PEG'siz, % 0,9 gellan gum ve % 6 sakkarozlu olan ortamın olduğu bildirilmektedir (Ramarosandratana et al., 2001).

Percy et al. (2000), *Pinus monticola*'nın klonal üretimine yönelik somatik embriyogenesis sistemi geliştirmek için yürütülen çalışmada, başlatma için en iyi sonuçların 2,25 μM BA ve 2,4-D'li değiştirilmiş Litvay ortamında elde edildiğini bildirmektedirler. Ayrıca, açık ve kontrollü tozlanan 18 aileyi temsilen yaklaşık 300

hattın soğukta muhafazasının ardından, en yüksek sayıda somatik embriyonun 120 μ M ABA, 180 μ M sakkaroz ve %1 gellan gum içeren olgunlaştırma ortamında elde edildiğini belirtmektedirler.

Pinus patula'nın altı genotipinden alınan embriyogenik dokular, hem somatik embriyoların olgunlaşması, hem de çimlenme protokolleri geliştirmek için bir miktar uygulamaya tabi tutulmuştur. PEG ile desteklenmiş, özellikle %7 ve 10 seviyelerinde, çok az değiştirilmiş 240 ortamının kullanımı üretilen embriyoların hem sayısını hem de kalitesini arttırmıştır. Çimlenme öncesi yapılan uygulamalardan, yaklaşık 4 hafta süreyle yüksek oransal nemdeki bölmeli kurutma uygulaması en iyi çimlenme sonuçları vermiştir (Jones and Van Staden, 2001).

Tang et al. (2001), *Pinus taeda*'nın açıkta tozlanan sekiz ailesinin olgun zigotik embriyolarını, her biri 36,2 μ M 2,4-D, 17,8 μ M BA, 18,6 μ M kinetin, 500 mg/L L-glutamin içeren, sekiz farklı temel tuz formülasyonunda 9 hafta kültüre almışlardır. Embriyogenik dokunun, olgun zigotik embriyoların kotiledon, hipokotil ve radisilleri üzerinde oluştuğunu belirtmişlerdir. Oksin ve sitokinin konsantrasyonunun 1/5 'ini içeren kallus teşvik ortamıyla aynı olan, kallus çoğaltma ortamında 9 hafta alt kültüre alınan kallusta, embriyogenik süspensör yığını (ESM) içeren, embriyogenik kallus elde etmişlerdir. Embriyogenik doku şeklinde form kazanan eksplantların en yüksek frekansının, %17 ile sırasıyla, 720, 1900, 400, 250, 25,8 ve 25,35 mg/L; KNO₃, Ca(NO₃)₂·H₂O, NH₄NO₃, KCl, ZnSO₄·7H₂O ve MnSO₄·H₂O içeren, değiştirilmiş MS temel tuz ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Pinus taeda'da somatik embriyogenesis yoluyla bir rejenerasyon planı geliştirmek için somatik embriyogenesis ve bitkicik rejenerasyonu üzerine ailelerin, kültür ortamının, ABA, PEG ve aktif karbonun etkisini belirlemek için bir çalışma yürüten Tang (2001), *Pinus taeda*'nın üç ailesini olgun zigotik embriyoları teşvik etmek amacıyla 9 hafta boyunca kültüre almış, zigotik embriyonun farklı bölgelerinde oluşan kallusu, kallus çoğaltma ortamında 9 hafta süreyle alt kültüre almıştır. Embriyogenik süspensör kültürlerinin, embriyogenik kallusun, sıvı kallus çoğaltma ortamında kültüre alınmasıyla kurulduğu bildirilmektedir. Embriyonal süspensör yığınları ve olgunlaşmamış somatik embriyoları içeren sıvı kültürlerin kotiledonal somatik embriyo üretimini arttırmak için ABA, PEG ya da aktif karbon içeren ortama aktarıldıktan sonra olgunlaşan somatik embriyoların azaltılmış sakkaroz,

aktif karbon, BA, GA ve IBA içeren ortamda 4–12 haftada rejener bitkicik olarak çimlendiği belirtilmektedir.

Pullman et al (2003a), somatik embriyogenesis sonucu elde edilen somatik embriyolardan çimlenebilen *Pinus taeda* somatik embriyolarının gelişimini arttıracak yetenekte bir olgunlaşma ortamının % 2 maltoz, %13 PEG, 5 mg/L ABA ve 2,5 g/L gelrite ile kombine edilerek değiştirilmiş ½ P6 tuzlarından oluşan ortam olduğunu belirtmektedir.

Yine *Pinus taeda*'da embriyogenik kültürlerin başlatılması ve somatik embriyo gelişiminin açıklandığı başka bir çalışmada, embriyogenik dokunun 2–5 mg/L 2,4-D ve 0–1 mg/L BA'lı ya da dışsal bitki büyüme düzenleyicisiz MS temel ortamda tam megagametofitli zigotik embriyolardan başlatıldığı bildirilmektedir. En yüksek başlatma frekansının (%5) ise 3 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L BA'lı DCR temel ortamında, kotiledon primordia gelişiminden hemen önce, 0,5 mm'den daha az bir kalınlıktaki bir klonun izole edilmiş zigotik embriyolarından elde edildiği bildirilmektedir (Becwar et al., 1990).

Malabadi et al. (2004), *Pinus kesiya* embriyogenik kültürlerinin ince apikal koni bölgeleri kullanılarak kurulduğunu bildirmektedirler. İnce apikal koni bölgesinin %0,3 aktif karbonla 4°C'de ön kültürüyle, embriyogenik kallus ürettiğini ve sürdürme (koruma) ortamında bu embriyogenik kallusların olgunlaştırma ortamına aktarılmadan alt kültürlerinde öncül embriyoların üretildiğini belirtmektedirler. *Pinus kesiya*'nın somatik embriyolarının olgunlaşması gellan gum'ın yüksek konsantrasyonlarıyla ve kısmi kurutma aracılığıyla elde edilmiş olgunlaştırma ortamına aktarılmadan önce öncül embriyolu embriyogenik kallusun 24 saatlik bir kurutma uygulaması sonucunda, olgunlaşma frekansının %21,5'ten 67,3'e yükseldiğini bildirmektedirler.

Attree and Fowke, 1991 ve Becwar et al., 1989'a atfen, Malabadi et al. (2004), "embriyogenik kültürlerin başlatılmasının pek çok faktör tarafından etkilendiğini ve bunlar arasında en önemlisinin doğru hasat zamanı ve in vitro çalışmalar için kullanılacak olan uygun eksplantın seçimi" olduğunu bildirmiştir. Doğru hasat zamanı ve uygun eksplantın seçimi çok önemlidir. "Çünkü farklı gelişim

safhalarındaki bir organ ya da dokunun çeşitli hücreleri in vitro'ya tepkide kendi yeterliliklerinde farklıdır.”

İbrelilerde embriyogenik doku başlatılmasına brassinolide'in etkisinin araştırıldığı çalışmada, kontrol ortamı (brassinolide yok) ve 0,1 µM brassinolide ile desteklenmiş ortamın kullanımının *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies* ve *Oryza sativa* başlatma yüzdelerini, sırasıyla %15'ten 30,1'e, %16,1'den 36,3'e, %34,6'dan 47,4'e yükselttiğini belirtilmiştir. 50 mg/L aktif karbon, bakır ve çinkonun ayarlanmış düzeyleri (aktif karbon tarafından adsorbe edileni karşılamak için), %1.5 maltoz, %2 myo-inositol, 500 mg/L casamino asit, 450 mg/L glutamine, 2 mg/L NAA, 0,63 mg/L BA, 0,61 mg/L kinetin, 3,4 mg/L gümüş nitrat, 10 µM 8-Br-cGMP, 0,1 µM brassinolide ve 2 g/L gelrite ile değiştirilmiş ½ P6 tuzlarının kombine edilmesiyle başlatmanın geliştirildiğini ve *Pinus taeda*'nın açık tozlanan 12 ailesinde başlatma yüzdelerinin %2,5'ten %50,7'ye sıralandığı bildirilmektedir (Pullman et al., 2003b).

Pinus taeda'da kültürün başlatılması, 50 mg/L aktif karbonun varlığında sitokinin seviyelerinin arttırılmasıyla ve ABA (3,7 µM), gümüş nitrat (20 µM) ve 8-Br-cGMP (10 µM)'nin ortama ilavesiyle geliştirilmiştir (Pullman et al., 2003c).

Şan (2005), apomiktik olan ve olmayan farklı ceviz tip ve çeşitlerinin tohumlarından alınan olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında, somatik embriyogenesisin ve bitki rejenerasyonunun farklı besin ortamlarında ve uygulamalarla elde edildiğini belirtmektedir. Bu amaçla araştırmacı, eksplantları öncelikle 1 mg/L BA, 2 mg/L kinetin, 0,01 mg/L IBA ve 250 mg/L L-glutamin, 30 g/L sakkaroz ve 2,1 g/L gelrite ilave edilmiş DKW (Driver and Kuniyuki ceviz) besin ortamında 3 hafta süreyle kültüre almıştır. Daha sonra eksplantları, hormon ve L-glutamin içermeyen DKW temel besin ortamında 4'er haftalık 4 alt kültüre almıştır. Bu besin ortamlarında elde edilen somatik embriyolarda ise kurutma, soğuklatma ve farklı dozlarda GA₃ uygulaması tek tek ya da kombine olarak denenmiş ve farklı tip ve çeşitlerde farklı oranlarda bitkicik rejenerasyonu sağlandığını bildirmiştir.

Pinus taeda L.'de embriyogenik doku başlatılmasına ortama organik asit, B₁₂ ve E vitamini ilavesinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise B₁₂ ve E vitamini ile α-

ketoglutaric, pyruvic ve succinic asitin tek tek ya da kombine halde ortama ilavesinin başlatmayı arttırdığı ifade edilmektedir (Pullman et al., 2006).

Pinus panderosa Dougl. Ex. Laws'da koltuk tomurcuğu oluşumuna, eksplantların toplanma zamanı, eksplantların alındığı ağacın (29 ve 34 yaşlı ağaçlar) konumu ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Ekim ayı sonlarına doğru toplanan eksplantlarda koltuk tomurcuğu oluştuğu, Şubat ayında toplananlarda ise kallus oluştuğu gözlemlenmiş; ayrıca ağacın üst kısımlarından alınan eksplantların, alt kısımlarından alınanlara göre koltuk tomurcuğu oluşumunda önemli derecede farklı olduğu belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada, eksplantların 2,2 μM BA ve 5.4 μM NAA içeren MS ortamında uzadığı ve basal ibre primordialarının kabardığı; eksplantlar 4,4 μM BA içeren MS ortamına aktarıldığında eksplantların % 59'unun koltuk tomurcuğu oluşturduğu bildirilmektedir (Lin et al., 1991).

Pinus canariensis'te tomurcuk oluşumu için yapılan bir çalışmada, 0 ve 3 günlük eksplantlar sırasıyla 8 ve 4 saat boyunca tamponlanmamış bir 100 μM BA solüsyonuna maruz bırakıldıktan sonra % 3 sakkaroz ve % 0,8 Difco Bacto agar içeren yarı seyreltik Bornman ortamına aktarıldığında, kotiledonal eksplantların % 97'sinin 14 tomurcuk/eksplant oluşturduğu belirtilmektedir (Pulido et al., 1992).

Pulido et al., (1994), *Pinus canariensis*'te BA, kinetin, zeatin ve 2-isopentyl-adenin'in farklı kombinasyonlarının kotiledonal eksplantların tomurcuk oluşturmaya etkilerini araştırmışlardır. Araştırma bulgularına göre en yüksek sayıda tomurcuğun 10 μM BA'da elde edildiğini kaydetmişlerdir.

Pinus roxburghii Sarg.'da kültüre alınan eksplantlarda tomurcukların patlayıp sürmesinin 11,1 μM BA ile güçlendirilmiş yarı seyreltik DCR ortamında elde edilebildiği işaret edilmektedir (Parasharami et al., 2003).

Kanwar and Narkhede (1996), *Pinus roxburghii* Sarg.'da tomurcuk eksplantlarının, 4,0 mg/L BA, 0,5 mg/L IBA içeren MS ortamında 8 hafta kültüre alındıktan sonra büyüme düzenleyicisi içermeyen aynı ortamda 4'er haftalık 2 alt kültür sonunda uzadıklarını kaydetmişlerdir.

Batı beyaz çamı olarak adlandırılan *Pinus monticola*'nın tomurcuk eksplantları üzerinde sürgün teşvikini açıkladıkları çalışmalarında Lapp et al. (1996), en iyi eksplantın erken kış tomurcuklarının 2 mm kalınlıktaki dilim kesitleri olduğunu belirtmektedirler. Bu eksplantların 1–3 yaşlı ağaçlardan alındığında en iyi büyümeyi 1-30 μ M BA içeren Litvay's ortamında gösterdiklerini, daha yaşlı ağaçlardan alındığında ise Gupta ve Durzan'ın zeatin riboside içeren DCR ortamında gösterdiğini bildirmektedirler.

Taxus mairei'de yapılan tomurcuk kültüründe ise araştırmacılar, köklendirilmiş çelikten elde edilen 1 yaşlı bitkicikten ve 1000 yaşlı ağaçtan elde ettikleri tomurcuk eksplantlarını kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, bitkicikten alınan eksplantın, ağaçtan alınana göre 2,5 mg/L BA içeren MS ortamında daha fazla sürgün oluşturduğunu bildirilmiştir (Chang et al., 2001).

Zhang et al. (2003), *Pinus radiata*'nın farklı yaştaki ağaçlarından elde ettikleri tomurcuk eksplantlarını, 5 mm kalınlıkta disk şeklinde kestikten sonra 5 mg/L BA içeren Le Poivre ortamında kültüre almışlar ve bu ortamda tomurcuk eksplantlarının sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Conifer türlerinin sürgün organogenesisi ve/veya somatik embriyogenesisi ile başarılı çoğaltılması üzerine bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *Pinus* türlerinde çoğaltmanın zor olduğu düşünülmektedir (Salajova et al, 1999) ve sadece az sayıda *Pinus* türü embriyogenik ve/veya somatik dokulardan tekrar çoğaltılabilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2007 yılında Ocak-Kasım ayları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Somatik Embriyogenesis Denemesi

Denemede kullanılan fıstıkçamı tohumları (Şekil 3.1), Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde bulunan ağaçlardan Ocak ayında toplanmış ve kullanılıncaya kadar 4°C' de tutulmuştur.



Şekil 3.1: Denemelerde kullanılan fıstıkçamı tohumları

3.1.2. Tomurcuk Kültürü Denemesi

Denemelerin tomurcuk kültürü bölümleri için kullanılan sürgünler de (Şekil 3.2) Eylül-Ekim aylarında Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde bulunan 9–10 yaşlı genç ağaçlardan temin edilmiştir.



Şekil 3.2. Denemelerde kullanılan sürgünler

3.2. Yöntem

3.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması

Besin ortamları hazırlanırken stok solüsyonlardan gerekli miktarlar pipet yardımıyla çekilerek bir erlenmayer içerisinde steril saf su ile belirli miktara tamamlanmıştır. Ortamların pH değeri 0,1 N ve 1,0 N HCl (Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30926, Germany) ve NaOH (Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30926, Germany) ile 5,7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra katılaştırıcı olarak agar veya gelrite ilave edilen ortamlar, 121°C'de 1,2 kg/cm² basınç altında 35 dakika (500 ml hacim için) tutularak sterilize edilmiştir. L-Glutamine solusyonu 0,22 µm poroziteli filtreden (Sartorius, Minisart. Vivascience AG 30625 Hannover, Germany) geçirilerek sterilize edildikten sonra 55°C'ye soğutulmuş besin ortamlarına ilave edilmiştir (Pullman, 2007, yazılı görüşme).

3.2.1.1. Somatik embriyogenesis denemesi

Fıstıkçamı için literatürde yeterli bilgi bulunmadığından diğer Pinus türleri için kullanılmış somatik embriyogenesis ortamları kullanılmıştır. Bu amaçla fıstıkçamı somatik embriyogenesis denemelerinde, başlangıç ortamı olarak, Pullman et al, (2005)'in Pinus taeda için kullandığı 1214 ortamı değiştirilerek, DCR -Douglas fir Cotyledone Revised- (Gupta and Durzan, 1985) ortamı, LP ortamı -Quoirin and LePoivre Medium- (Gonzales et al., 1998) değiştirilerek kullanılmıştır. Çoğaltma ortamı olarak da 1250 ortamı (Pullman et al., 2006) değiştirilerek seçilmiştir. Adı

geçen besin ortamlarının içerikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Büyüme düzenleyiciler ‘başlangıç ortamları’nda üç seviyeli olarak kullanılmıştır:

1. Seviye: 0,45 mg/L BA + 0,43 mg/L Kin + 2,00 mg/L NAA
2. Seviye: 0,55 mg/L BA + 0,53 mg/L Kin + 2,00 mg/L NAA
3. Seviye: 0,63 mg/L BA + 0,61 mg/L Kin + 2,00 mg/L NAA.

1,’den 3’e kadar olan seviyelerine göre sırası ile DCR-1, LP-1 ve 1214-1’den DCR-3, LP-3 ve 1214-3’e kadar isimlendirilmiştir.

Somatik embriyo ‘çoğaltma ortamı’nda büyüme düzenleyici olarak;

0,45 mg/L BA + 0,43 mg/L Kin + 1,1 mg/L 2,4-D kullanılmıştır.

3.2.1.2. Tomurcuk kültürü denemesi

Tomurcuk kültürü için de $\frac{1}{2}$ DCR ortamı değiştirilerek kullanılmıştır. Bu besin ortamının içeriği Çizelge 3.1’de listelenmiştir. Sürgün segmenti kültürü denemelerinde ise kullanılan büyüme düzenleyicileri miktarına göre 7 seviye oluşmuştur:

- 1.Seviye: 0
- 2.Seviye: 2,0 mg/L BA
- 3.Seviye: 4,0 mg/L BA
- 4.Seviye: 6,0 mg/L BA
- 5.Seviye: 2,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA
- 6.Seviye: 4,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA
- 7.Seviye: 6,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA

Sürgün segmenti denemelerindeki besin ortamları seviyelerine göre sırası ile $\frac{1}{2}$ DCR 0’dan $\frac{1}{2}$ DCR6’ya kadar isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.1: Denemelerde kullanılan değiştirilmiş besin ortamlarının içerikleri

Besin ortamları	LP	DCR	1214	1250
İçerikleri	mg / L			
NH ₄ NO ₃	400	400	200	603,8
KNO ₃	1800	340	909,9	909,9
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	85	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	175,79	370	246,5	246,5
KH ₂ PO ₄	270	170	136,1	136,1
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,76	22,3	10,5	10,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	14,668	14,4
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	15,5	15,5
KI	0,08	0,83	4,15	4,15
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,125	0,125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,25	0,1725	0,125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,125	0,125
NaFeEDTA	37,3	37,3	18,65	9,93
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	833,77	556	236,2	236,2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	13,9	9,95
NiCl ₂	-	0,025	-	-
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	-	256,5	256,5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	101,7	101,7
AgNO ₃	-	-	3,398	-
Aktif karbon	50	50	50	-
Kazamino asitler	500	500	500	500
L-glutamin	450	450	450	450
Miyo-inositol	1000	1000	1000	1000
Glisin	2,0	2,0	2,0	2,0
Thiamin HCl	1,5	1,5	1,5	1,5
Piridoksin HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Nikotinik asit	0,5	0,5	0,5	0,5
Biotin	0,05	0,05	0,05	0,05
Folik asit	0,5	0,5	0,5	0,5
Askorbik asit	2,5	2,5	2,5	2,5
Maltoz	-	-	15000	-
Sakkaroz	30000	30000	-	30000
Agar	6000	6000	-	-
Gelrit	-	-	2000	2500

3.2.2. Tohumların ve sürgün parçalarının sterilizasyonu

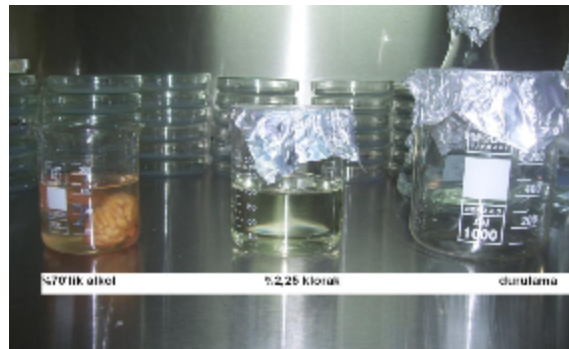
3.2.2.1. Somatik embriyogenesis denemesi

Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği arazisinde serbest ve yabancı tozlanmış fıstıkçamı kozalakları 2007 Ocak ayında ağaçlardan alınmış ve taş ile parçalanarak kabuklu tohumlar çıkarılmıştır. Ocak-Eylül ayları arasında yapılan denemelerde bu tohumlar kullanılmıştır. Elde edilen tohumlar sert kabukları kırılarak uzaklaştırıldıktan sonra, % 70'lik etil alkolde (Sigma – Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30926, Germany) 2 dakika tutulmuştur. Ardından % 2,25'lik sodyum hipoklorit (Klorak[®], İzmir) çözeltisi içinde

20 dakika sürekli karıştırılarak bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra, 5'er dakika 3 defa steril saf su ile durulama yapılmıştır.

3.2.2.2. Tomurcuk kültürü denemesi

Genç ağaçların 1 yıllık sürgünlerinin ucunda oluşan sürgün tomurcukları, bir yıllık sürgünlerle birlikte ağaçtan kesilerek ayrıldıktan sonra üzerlerinde bulunan ibre yaprak çiftleri tek tek kopararak uzaklaştırılmıştır. Kaba kirlerinden arındırmak için 2–3 damla bulaşık deterjanı içeren yaklaşık 500 ml musluk suyunda 1 saat yıkandıktan sonra yine 1 saat boyunca akan musluk suyu altında tutulmuştur. Ardından % 70'lik etil alkolde 2 dakika bekletildikten sonra, % 2,25'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 20 dakika sürekli karıştırılarak bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra, 5'er dakika 3 defa steril saf su ile durulama yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Denemelerde kullanılacak eksplantların sterilizasyon aşamaları

3.2.3. Dikimi yapılacak parçaların hazırlanması ve dikimi

3.2.3.1. Somatik embriyogenesis denemesi

Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar, nemlendirilmiş steril kurutma kağıtları (2 kat altta 1 kat üstte) arasında 10 cm'lik petri kapları içinde, su alıp şişmesi için, karanlık koşullarda ve oda sıcaklığında (23 ± 2 °C) 24 saat bekletilmiştir. Su alıp şişen tohumlar, steril kabin koşullarında pens ve bisturi yardımıyla boydan yarılarak lobut şeklindeki embriyoları zedelenmeden çıkarılmıştır. Bu embriyolar, DCR-1, DCR-2, DCR-3, LP-1, LP-2, LP-3 ve 1214-1, 1214-2, 1214-3 somatik embriyo başlangıç ortamlarını içeren petrilere (her bir petriye 15 adet embriyo) yerleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Başlangıç ortamına yerleştirilen embriyolar

Embriyolar bu besin ortamlarında kotiledonların biraz büyüyüp ayrılacak duruma gelmesi için 2 hafta tutulmuştur. İki hafta sonra kotiledonlar her bir petride yaklaşık 40 adet ve 3 tekerrürlü olacak şekilde aynı ortamlarda alt kültüre alınmıştır. Bu besin ortamında kotiledonlar yaklaşık 3–4 hafta iklim odasında $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık koşullarda tutulmuştur. Bu aşamadan sonra eksplantlar '1250' embriyo çoğaltma ortamına aktarılmıştır ve petriker düzenli olarak kontrol edilerek kalluslanma oranları (%) ve kalluslardaki değişimler kaydedilmiştir. Somatik embriyogenesis denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Eylül 2007 tarihinde yapılan kültürlerden elde edilen sonuçlar, 'Tarist' İstatistik Programında analiz edilerek ortalamalar arası farklar, 'Duncan' testiyle değerlendirilmiştir. Analizlerde ortalamaların Arcsin değerleri kullanılmıştır.

3.2.3.2. Tomurcuk kültürü denemesi

Sterilize edilmiş sürgünler steril kabin koşullarında yaklaşık 5–8 mm'lik segmentler şeklinde kesilmiştir. Bu segmentler 10 cm'lik bir petride 10'ar adet olacak şekilde besin ortamlarına dikey olarak yerleştirilmiştir. Sürgün segmentlerini içeren petriker iklim odasında $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 16 saat fotoperiyot koşulunda tutulmuştur. İklim odasında ışık şiddeti 4000 lux olarak ölçülmüştür (Lutron LX-101 Dijital Lux Metre). Bu aşamada petriker düzenli olarak her hafta kontrol edilmiş, gözlem yapılarak kalluslanma, tomurcuk kabarmaları ve iğne yaprak çıkışları kayıt edilmiştir. Tomurcuk kültürü denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Ekim 2007 tarihinde yapılan kültürlerden elde edilen

sonuçlar, ‘Tarist’ istatistik programında analiz edilerek ortalamalar arası farklar ‘Duncan’ testiyle değerlendirilmiştir. Analizlerde ortalamaların Arcsin değerleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Somatik Embriyogenesis Denemesi

Olgun embriyolardan izole edilen kotiledon eksplantları üzerinde $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve karanlık koşullarında dikimden 3–4 gün sonra kallus oluşmaya başlamış ve kültürün 4. haftasında eksplantlardaki kalluslanma oranı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Gelişen kallus dokusu beyaz renkte ve sulu, saydam yapıda olmuştur.

Çizelge 4.1. Somatik embriyo başlangıç ortamlarında kotiledonlar üzerinde kalluslanma durumu

Besin Ortamı	Başlangıç Ortamına Yerleştirilen Kotiledon Sayısı	Başlangıç Ortamında Kalluslu Kotiledon Sayısı	Kalluslu Kotiledon Oranı (%)
LP-1	184	131	71,28
LP-2	153	8	5,56
LP-3	174	101	58,18
DCR-1	159	104	65,46
DCR-2	0	0	0
DCR-3	105	82	80,35
1214-1	138	74	54,32
1214-2	155	122	78,53
1214-3	163	74	45,71

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi en çok kalluslanma %80,35 oranla DCR-3 ortamında meydana gelmiş, bunu sırasıyla %78,53 ile 1214-2, LP-1 (%71,28) ortamları izlemiştir. LP-2 ortamına yerleştirilen eksplantlarda ise çok az bir gelişme gözlenmiştir. Bu ortama konan kotiledon eksplantlarının çoğunluğu, besin ortamına yerleştirildiği şekil ve renkte kalmışlardır. Bu durum çoğaltma ortamında da değişmemiştir. DCR-2 ortamında ise yoğun bakteri bulaşması sonucu, hiçbir eksplant başlatma ortamına yerleştirilememiştir.

Yapılan istatistikî analiz sonuçlarına göre kullanılan besin ortamları ile büyüme düzenleyicileri seviyeleri arasındaki ilişki önemlidir (A X B interaksyonu, $P=0,01$). Bitki büyüme düzenleyicileri seviyeleri ile besin ortamları arasında ilişki çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Besin ortamları ve büyüme düzenleyicileri seviyelerinin kalluslanma üzerine etkisi (A X B interaksiyonu)

Besin Ortamı	Seviye		
	1	2	3
LP	71,28	5,56 ab	58,18
DCR	65,46	0 b	80,35
1214	54,32	78,53 a	45,71
LP	71,28 a	5,56 b	58,18 ab
DCR	65,46	0	80,35
1214	54,32	78,53	45,71
LP	71,28	5,56	58,18
DCR	65,46 a	0 b	80,35 a
1214	54,32	78,53	45,71

Çizelge 4.2'ye göre, 1.seviye göz önüne alındığında; LP, DCR ve 1214 ortamları arasında kalluslanma oranı açısından fark bulunmamıştır (P=0,01).

İkinci seviyede kalluslanma oranları istatistikî olarak önemli olmamakla birlikte 1214 ortamı (%78,53) , LP ortamından (%5,56) daha fazla kallus oluşturmuştur.

Üçüncü seviyede besin ortamları arasında istatistikî olarak fark yoktur (P>0,01).

LP besin ortamında, 1. seviye (%71,28) 2. seviyeden (%5,56) daha yüksek kalluslanma oluşturmuştur (P=0,01).

DCR besin ortamında 1. seviye (% 65,46) ve 3. seviye (% 80,35) yüksek kalluslanma oranı oluşturmuştur.

1214 ortamında kullanılan farklı büyüme düzenleyicileri seviyeleri arasında istatistikî yönden farklılık yoktur.

Başlangıç ortamında 5. haftadan itibaren bazı kallus dokularında rengin sararmaya başladığı ve dokuların yaşlandığı gözlenmiştir. Bu sararan eksplantlar iptal edilerek kalan açık renk kalluslu eksplantlar 'çoğaltma ortamında (1250)' alt kültüre alınmıştır.

Kültürün 6.haftasında çoğaltma ortamında eksplantlardaki gelişme durumu çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'e göre, çoğaltma ortamında 6. hafta sonunda açık

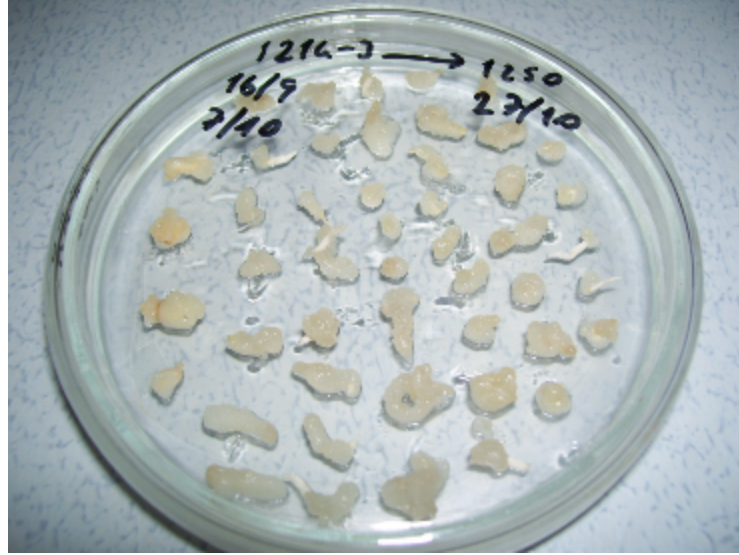
renkli kallusa sahip eksplant yüzdesi 1214-1 ortamından gelenlerde en yüksek (%32,97) bulunmuş (Şekil 4.1), bunu yine 1214 ortamının 3. (%15,27) ve 2. (%11,11) seviyelerinden gelenler izlemiştir (Şekil 4.2). Görüldüğü gibi 1214 ortamında kallus yaşlanması LP ve DCR ortamlarına göre daha yavaştır.

Çizelge 4.3. Somatik embriyo çoğaltma ortamına aktarılan kalluslu eksplantlarda gelişme durumu

Besin Ortamı	5. Haftada Çoğaltma Ortamına Aktarılan Eksplant Sayısı	6. Haftada Çoğaltma Ortamındaki Açık Renkli Eksplant Sayısı	Açık Renkli Eksplant %
LP-1	61	3	4,92
LP-2	127	0	0,00
LP-3	93	0	0,00
DCR-1	124	11	8,87
DCR-2	0	0	0,00
DCR-3	81	2	2,47
1214-1	91	30	32,97
1214-2	108	12	11,11
1214-3	131	20	15,27



Şekil 4.1. Embriyo çoğaltma ortamında, 1214-1 ortamından gelen kalluslu kotiledonların görünüşü

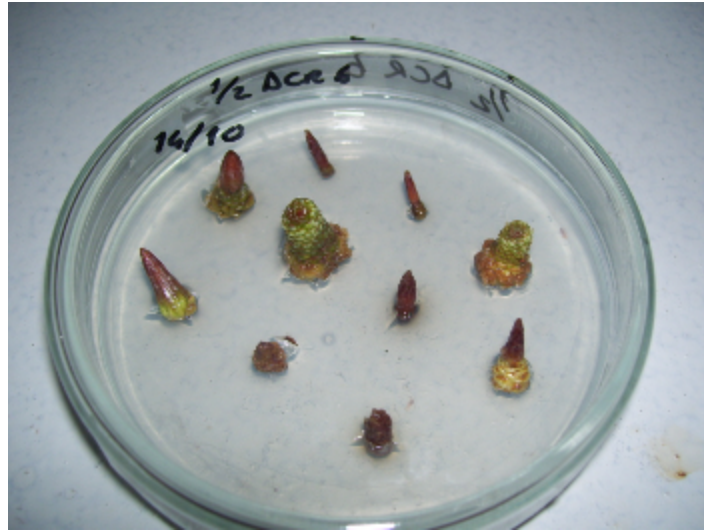


Şekil 4.2. Embriyo çoğaltma ortamında, 1214-3 ortamından gelen kalluslu kotiledonların görünüşü

Kültürün 7. haftasından itibaren çoğaltma ortamındaki eksplantların büyük bir çoğunluğunda kallus yaşlanması artarak somatik embriyo oluşmadan renk koyulaşmıştır

4.2. Tomurcuk Kültürü Denemesi

Tomurcuk sürdürmek amacıyla sürgün segmentleri Ekim ayında, BA ve NAA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının değişken olarak kullanıldığı yedi farklı seviyedeki $\frac{1}{2}$ DCR besin ortamında kültüre alınmıştır. Fotoperiyot koşulunda (16 saat) kültüre alınan sürgün segmentlerinde her hafta düzenli olarak kontroller yapılmış ve altıncı hafta içinde yapılan gözlemlerde segmentler üzerinde görülen kalluslanma ve tomurcuk kabarmaları 'gelişen sürgün segmenti' olarak sayılmıştır (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Besin ortamına yerleştirilmiş sürgün segmentlerinin görünüşü

Farklı seviyelerdeki besin ortamlarının sürgün segmenti gelişmesi üzerine etkileri çizelge 4.4'te görülmektedir.

Çizelge 4.4. Sürgün segmentlerinde kültürün 6. haftasındaki gelişme

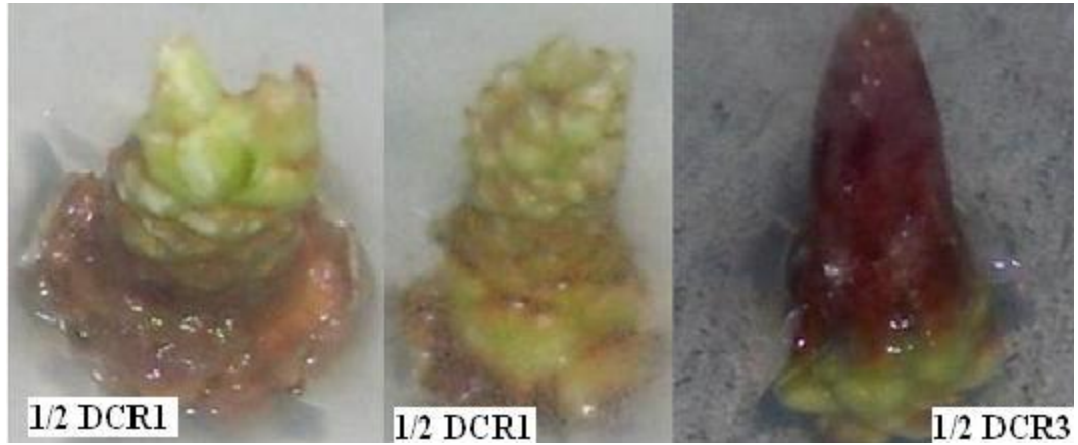
Besin Ortamı	Kültüre Alınan Sürgün Segmenti Sayısı	6. Haftada Kalan Sürgün Segmenti Sayısı	Gelişen Sürgün Segmenti Oranı (%)
1/2 DCR 0	30	28	7,50 c
1/2 DCR 1	30	22	32,86 bc
1/2 DCR 2	30	12	41,67 ab
1/2 DCR 3	30	30	50,00 ab
1/2 DCR 4	30	29	41,85 ab
1/2 DCR 5	30	9	55,56 ab
1/2 DCR 6	30	26	70,00 a

Tomurcuk kültürü için denenen bitki gelişim düzenleyicilerinin 7 farklı seviyesini içeren $\frac{1}{2}$ DCR besin ortamları içerisinde eksplantlarda en yüksek tomurcuk kabarması ve kalluslanma görülen ortam %70,00 oranı ile $\frac{1}{2}$ DCR-6, ardından da %55,56 oranıyla $\frac{1}{2}$ DCR-5 ortamlarıdır. Bu ortamları sırasıyla, %41,85 ile $\frac{1}{2}$ DCR-4 ve %41,67 ile $\frac{1}{2}$ DCR-2 izlemektedir.

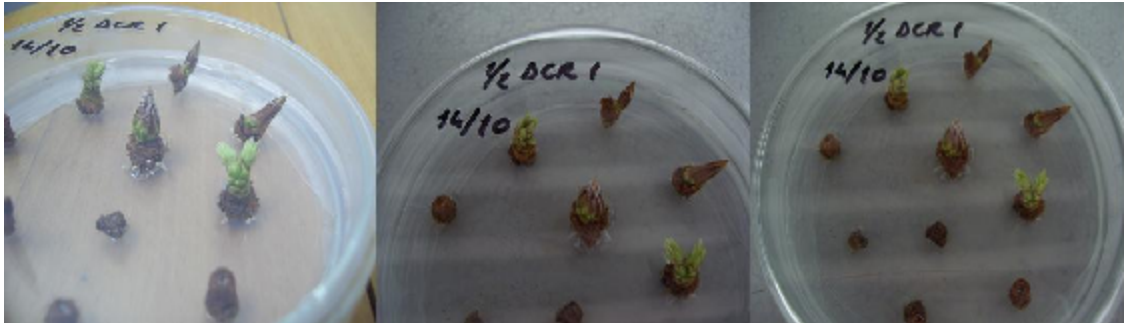
İstatistiksel analiz sonucunda, sürgün segmenti gelişmesi üzerine besin ortamı seviyelerinin etkisi ($P=0,05$ 'e göre) önemli çıkmıştır. $\frac{1}{2}$ DCR - 6 seviyesinde elde

edilen gelişme oranı (%70,00), $\frac{1}{2}$ DCR – 0 ve $\frac{1}{2}$ DCR – 1 seviyelerinden daha yüksek olmuştur. Bu oran $\frac{1}{2}$ DCR – 5 – 4 – 3 – 2 seviyelerinden de yüksek olmakla beraber istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır.

Bazı sürgün segmentlerinde ileri düzeyde tomurcuk kabarması ve iğne yaprak çıkışı görülmüştür (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Sürgün segmentleri üzerindeki tomurcuk kabarması



Şekil 4.5. Sürgün segmentleri üzerindeki iğne yaprak çıkışı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızlı, klonal çoğaltılmasında somatik embriyogenesis önemli bir potansiyele sahiptir. Bu yöntemde tek bir bitki parçasından, teorik olarak sınırsız sayıda embriyo üretmek mümkündür (Babaoğlu ve ark 2001).

Bu çalışmada ülkemiz tarım ürünleri dışsattımında önemli bir yere sahip ve Aydın ili Mazon yöresinde geniş bir yayılım gösteren fıstıkçamının somatik embriyogenesis ve tomurcuk kültürü teknikleri ile in vitro çoğaltılması üzerine araştırmalar yürütülmüştür.

Somatik embriyogenesis denemeleri için olgun tohumlardan çıkarılan embriyolar kültüre alınmış ve iki haftalık bir gelişmeden sonra kotiledonlar izole edilerek aynı özellikleri içeren ortama yerleştirilmiştir. Bu amaçla başlangıç ortamı olarak DCR, değiştirilmiş LP ve değiştirilmiş 1214 ortamları, çoğaltma ortamı olarak da değiştirilmiş 1250 ortamı kullanılmıştır. Kotiledon eksplantları üzerinde beyaz, saydam renkte ve sulu yapıda kallus dokusu oluşmuştur. Bu özellikleri ile dokunun embriyogenik olma ihtimali olmakla birlikte, 5 hafta sonunda dokuların çoğunluğu yaşlanarak sarı-kahverengine dönüşmüştür. Literatürden Pinus türlerinin somatik embriyogenesisine karşı zor (recalcitrant) tepki gösterdiği bilinmektedir ve fıstıkçamında yapılmış bir somatik embriyogenesis çalışmasına rastlanılmamıştır.

Bazı Pinus türlerinde olgunlaşmamış embriyolardan somatik embriyogenesis halihazırda başarılmıştır (Tang et al., 1997). Ancak başlangıç frekansı, tohum toplama zamanı ve zigotik embriyoların gelişme safhası tarafından etkilenmektedir. Olgun embriyolardan somatik embriyogenesis kontrolü pek çok odunsu ağaçlarda henüz başarılammıştır. Bu problemin çözümü için daha çok çaba gereklidir. Olgunlaşmamış embriyolardan somatik embriyogenesis işleminin otomasyonu üzerine araştırmalar yapılmalıdır. Diğer taraftan olgunlaştırma işleminin anlaşılması üzerine çaba harcanmaya devam edilmelidir. Olgunlaşma işlemi embriyogenesis esnasında başlamaktadır. Olgunlaşma ile ilgili pek çok morfolojik değişimler içsel metilsitosin seviyelerindeki artış ile ilişkilidir. Böylece genomik DNA'ın

metillenmesi bu sürece dahil olan başlıca moleküler mekanizmalardan birisidir. Olgun dokulardan oluşacak embriyogenesis konularına yeni bakış açıları, yeniden kuvvetlendirme teknikleri yoluyla metilasyonun kontrol edilmesi ile veya metilasyonu önleyici ilaçların dışarıdan eklenmesi yoluyla elde edilebilir (Salajova et al., 2005).

Bundan sonra yapılacak somatik embriyogenesis çalışmaları için bu besin ortamlarına, diğer *Pinus* türlerinde kullanılmış spesifik bazı maddelerin ilave edilerek denenmesi önerilebilir.

Sürgün segmentlerinde en yüksek gelişme ve kalluslanma görülen ortam, ½ DCR-6 ortamıdır. Bu ortamdaki gelişme oranı % 70,00'tir. Bu ortamı sırasıyla % 55,56 oranı ile ½ DCR-5 ortamı, % 50,00 oranı ile ½ DCR-3 ortamı ve % 41,85 oranı ile ½ DCR-4 ortamı izlemiştir. Bu sıralama, istatistikî olarak önemli olmamakla birlikte ortamlardaki BA oranının da azalış sırası (6, 4, 2 mg/L) ile örtüşmektedir. Literatürde fıstıkçamında sürgün organogenesisi için farklı ortamlar ve farklı BA dozları kullanılmıştır.

Gonzales et al., (1998) fıstıkçamı kotiledonlarının adventif tomurcuklarından, bitki rejenerasyonunun 4,5 µm (1 mg/L) BA içeren yarı seyreltik Le Poivre ortamında sağlandığını bildirmiştir.

Sul and Korban (2004) farklı tuz konsantrasyonları, karbon kaynakları, oksin ve sitokininin fıstıkçamı kotiledonlarında sürgün organogenesisine etkilerini açıkladıkları çalışmalarında, sakkaroz ve 30 µm (6,75 mg/L) BA içeren ½ MS ortamında en iyi sonucu almışlar, sürgünler aktif karbon içeren ve büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda uzama göstermişlerdir.

Valdes et al. (2001) ise, fıstıkçamının çimlenmiş embriyolarından izole edilerek in vitro kültüre alınan kotiledonların, 4,4 µM (1 mg/L) BA uygulamasına sürgün organogenesisi tepkisi verdiğini bildirmektedirler.

Pinus roxburghii Sarg.'da kültüre alınan eksplantlarda tomurcukların patlayıp sürmesinin 11,1 µM BA ile güçlendirilmiş yarı seyreltik DCR (1/2 Douglas fir cotyledone revised medium) ortamında elde edilebildiği işaret edilmektedir (Parasharami et al., 2003).

Bundan sonra yapılacak sürgün organogenesis denemelerinde farklı besin ortamlarında BA'nın daha yüksek konsantrasyonlarının da denenmesinde yarar vardır.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2004. Türkiye Orman Envanteri. 2004. Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü, Urla, İzmir.
- Anonim. 2007a. [<http://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87am>] Erişim Tarihi: 13.11.2007
- Anonim. 2007b. [http://www.egelihracatcilar.com/Asntent.Asp?MS=1&Content=3&MN01=9&MN02=4&MN03=0&MN04=0&MN05=0&ID=169&Url=Istap/Cotistik_Kriterler.Asp]. Erişim Tarihi: 02.11.2007
- Anonymous. 2007a. [<http://www.conifers.org/pi/pin>] Erişim Tarihi: 13.11.2007
- Anonymous. 2007b. [<http://www.pinenut.com/noha.htm>] Erişim Tarihi: 13.11.2007
- Babaoğlu, M., Gürel, E ve Özcan, S. 2002. Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları). Cilt 1. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 374 sayfa.
- Becwar, M. R., R. Nagmani. S.R. Wann, 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* 20 (6): 810–817.
- Chang, S.H., C.K. Ho, Z.Z.Chen, J.Y. Tsay, 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports* 20: 496–502.
- Çetin, T, 2003. Doğal Ortam-Ekonomik Faaliyet İlişkisine Bir Örnek: Kozak Yöresi (Bergama). *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi* Cilt 23, Sayı 1: 23–46.
- Deb, C.R. and P. Tandon, 2002. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus kesiyi* (Royle ex. Gord.). *Journal of Plant Biology* 29 (3): 301–306.
- Garcia-Férriz L, L. Serrano and A. Pardo, 1994. In vitro shoot organogenesis from excise immature cotyledons and microcuttings production in stone pine. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 36 (1): 135–140.
- Garin, E., M. Bernier-Cardou, N. Isabel, K. Klimaszewska, A. Plourde, 2000. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62 (1):27–37.
- Gaurav, M., S. Von Arnold, N. Rajani, 2000. Studies on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.). *Current Science* 79 (7): 999–1004.

- Genç, M. 2004a Silvikültürün Temel Esasları. SDÜ Basımevi. Orman Fak. Yay. No:44 Sayfa 9–15 ve 246–258.
- Genç, M. 2004b. Silvikültür Tekniği. SDÜ Basımevi. Orman Fak. Yay. No:46 Sayfa:193–196
- Gonzales, M.V. M. Rey, R. Tavazza, S. La Malfa, L. Cuozzo and G. Ancora, 1998. In vitro adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea* L. HortScience 33(4):749–750.
- Gupta, P.K. and D. J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4: 177–179.
- Haggman, H., A. Jokela, J. Krajnakova, A. Kauppi, K. Niemi, T. Aronen, 1999. Somatic embryogenesis of scots pine: cold treatment, characteristics of explant affecting induction. Journal of Experimental Botany 50 (431): 1769–1778.
- Jones, N.B., J. Van Staden, A.D. Bayley, 1993. Somatic embryogenesis in *Pinus patula*. Journal of Plant Physiology 142 (3): 366–372.
- Jones, N. B. and J. Van Staden, 2001. Improved somatic embryo production from embryogenic tissue of *Pinus patula*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 37 (5):543–549.
- Kanwar, K., S.K. Narkhede, 1996. In vitro multiple bud initiation from axillary bud explants of *Pinus roxburghii* Sargent. Annals of Forestry 4 (1): 101–106.
- Kırdar, E. 1998. Fıstıkçamında (*Pinus pinea* L.) Erken tohum verimini sağlamak amacıyla fidan yetiştirme teknikleri. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği A.B.D. Doktora Tezi, Zonguldak.
- Klimaszewska, K. and D.R. Smith. 1997. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. Physiologia Plantarum 100 (4): 949–957.
- Kurt, H. 2000. Fıstıkçamında (*Pinus pinea* L) aşı kaynaşması ve çelik köklenmesinin anatomik ve histolojik olarak incelenmesi üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri A.B.D. Doktora Tezi, Van.

- Lapp, M.S. J. Malinek and M. Coffey. 1996. Microculture of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1-to-7-year-old trees. *Tree Physiology* 16: 447–451.
- Lelu, M.A., C. Bastien, A. Drugeault, M.L. Gouez, K. Klimaszewska. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* 105 (4): 719–728.
- Li XinHuang, F.H. and E.E. Gbur, Jr. 1997. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 33 (3): 184–189.
- Lin, Y. M.R. Wagner and L.J. Heidmann. 1991. In vitro formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26 (3): 161–166.
- Malabadi, R.B. and C. Hiranjit. 2002. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord). *Applied Biological Research* 4 (1/2) :1–10.
- Malabadi, R. B. C. Hiranjit, P.Tandon. 2004. Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin apical dome sections in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.) promoted by partial desiccation and gellan gum. *Scientia Horticulturae* 102:449–459.
- Nagmani, R., A.M. Diner, G.C. Sharma. 1993. Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). *Canadian Journal of Forest Research* 23 (5): 873–876.
- Nergiz, C. and İ. Dönmez. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry* 86: 363–368.
- Özden, Ç. 2007. Avrupa Birliği Sert Kabuklu Meyveler Yerinde Pazar Araştırması. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Ar ge Başkanlığı, 188 sayfa, Ankara.
- Parasharami, V.A., I.S. Poonawala and R.S. Nadgouda. 2003. Bud break and plantlet regeneration in vitro from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *Current Science* 84 (2): 203–208.
- Percy, R. E. K. Klimaszewska, D.R. Cyr. 2000. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Canadian Journal of Forest Research* 30 (12):1867–187.

- Pulido, C., I.S. Harry T.A. Thorpe. 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29 (3): 247–255.
- Pulido, C., I.S. Harry and T.A. Thorpe. 1994. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39 (3):225 – 230
- Pullman, G. S, S. Johnson, G. Peter, J. Cairney, N. Xu. 2003a. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination and gene expression. *Plant Cell Reports* 21 (8):747–758.
- Pullman, G.S., Y. Zhang, B.H. Phan. 2003b. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22: 69–104.
- Pullman, G.S., K. Namjoshi, Y. Zhang. 2003c. Somatic emryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Rep.* 22:85–95
- Pullman, G.S. J. Mein, S. Johnson and Y. Zhank. 2004. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep.* 23: 596–605.
- Pullman, G.S. S. Johnson, S. Van Tassel and Y. Zhank, 2005. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): Improving culture initiation growth with MES pH buffer, biotin and folic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 91–103
- Pullman, G.S., R. Chopra, K.M. Chase. 2006. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: Improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, Vitamins B₁₂ and E. *Plant Science* 170:648–658.
- Pullman, G.S, 2007. Yazılı görüşme. L-Glutamine'nin stok solusyonu hazırlığı ve besin ortamına ilave edilmesi, School of Forest Resources, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA, Eposta jerry.pullman@ipst.edu
- Ramarosandratana, A. L. Harvengt, A. Bouvet, R. Calvayrac, M. Paques. 2001. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration of embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and

- maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 37 (1):29–34.
- Salajova, T., J. Salaj, A. Kormutak. 1999. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science* 145: 33–40.
- Salajova T., Rodriguez R., Canal M.J., Diego L.B., Berdasco M. Radojevic L. and J. Salaj. 2005. Protocol of somatic embryogenesis of *Pinus nigra* Arn In: *Somatic Embryogenesis of In Woody Plants – Gymnosperms*, vol.3, Kluwer, The Netherlands. S.M. Jain and P.K. Gupta (eds.), pp. 81–93.
- Schestibratov, K.A., R.V. Mikhailov, S.V. Dolgov. 2002. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 139-146.
- Sul, I. and S.S. Kobran. 2004. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins and auxins on shoot organogenesis from cotyledons *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 43 (3):197-205.
- Şan, B. 2005. Apomiktik olan ve olmayan bazı ceviz (*Juglans regia* L.) genotiplerinde olgunlaşmamış kotiledonlardan somatik embriyo oluşumu ve bitki regenerasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri A.B.D. Doktora Tezi, Ankara.
- Tang, W., OuYang Fan, Z. Guo. 1997. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* L.). *Journal of Plant Resources and Environment* 6 (2): 8-11.
- Tang, W. and Z. Guo. 2000. In vitro propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33: 25–31.
- Tang W., Z. Guo, Ouyang Fan. 2001. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 37(5):558-563.
- Tang, W. 2001. Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic cultures derived from mature loblolly pine zygotic embryos by suspension culture and medium selection. *Forestry Studies in China* 3 (2):1–9.

- Valdes, A.E., R.J. Ordas, B. Fernandez, and M.L. Centeno. 2001. Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 377–384.
- Zhang, H., K.J. Horgan, P.H.S. Reynolds and P.E. Jameson. 2003. Cytokinins and bud morphology in *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum* 117:264–269.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğrul Tomba
Doğum Yeri ve Tarihi : Torbalı, 07.12.1976

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Bölümü 1994 – 1998
Lisansüstü Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı 2004 – 2007
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Torbalı Orman Fidanlığı 1998 – 2001
Merko Gıda San ve Tic. A.Ş. 2001 – 2001
Ege Plantek Çiçekçilik Ltd. Şti. 2001 – 2005
Melike Botanik 2005 – 2005
Milas Tarım Hay. Gıda San. ve Tic. A.Ş. 2007 – 2008

İLETİŞİM

E-posta Adresi : tugrultomba@hotmail.com
Tarih : 30.11.2007