

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEK ANTEPFISTIĞI (*PISTACIA VERA* L. cv. "Atlı")
AĞAÇLARININ *IN VITRO* MİKROÇOĞALTILMASI

Engin TİLKAT

(DOKTORA TEZİ)
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Eylül – 2006

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Engin TİLKAT tarafından yapılan "Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L. ev. "Atlı") Ağaçlarının Mikroçoğaltılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Unvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Davut BAŞARAN

Üye : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Ahmet ONAY

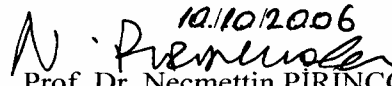
Üye : Doç. Dr. Ömer YAVUZ

Üye : Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 06/09/2006

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

10.10.2006

Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'in danışmanlığında yürütülmüştür. Bu imkanı sağladıklarından ve her türlü yakın ilgilerinden dolayı kendilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana çok büyük destek olan ve deneysel çalışmalarım sırasında bile çok değerli yardımlarını, sıcaklık ve desteğini gördüğüm, danışmadık hiçbirşey bırakmadığım, derin bilgi ve deneyimlerini sürekli benimle paylaşan ve iyi bir akademisyen olma yolunda beni hep motive eden ve yol açan sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a da ayrıca teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarım esnasında çok değerli yardım, destek ve sıcaklıklarını gördüğüm sayın hocalarım Yrd. Doç Dr. Çiğdem IŞIKALAN'a, Dr. Filiz ADIYAMAN AKBAŞ'a, Yrd. Doç Dr. Süreyya NAMLI'ya ve Biyoloji bölümüne başladığım ilk yıldan bugüne her zaman güler yüzlülüğünü, sıcaklığını, samimiyetini ve engin bilgisini benden esirgemeyen, hatta doktora çalışmamın son dönemlerinde aynı zamanda Fransızca hocam da olan sayın Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a da teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca bu zorlu doktora çalışmamın en zor anında karşıma çıkan ve sevgi, ilgi, destek ve yakınlığını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Özlem ERTEKİN'e arkadaşım ve dostum Deniz ÖKSÜZ ile Gökhan YÜRÜMEZ'e de sevgi, minnet ve teşekkür duygularımı ifade etmek isterim.

Son olarak beni bu seviyeye getiren her türlü ihtiyaç ve yardıma koşan ve her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem Remziye TILKAT ve babam Zülküf TILKAT'a, kardeşlerim Sabahattin, Sabiha, Sinem ve Mustafa TILKAT'a sonsuz teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu proje Koordinatörlüğü tarafından DÜAPK 05-FF-23 numaralı proje ile ve TÜBİTAK TOVAG tarafından 3355 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	III
AMAÇ	VI
ÖZET	VIII
SUMMARY	X
KISALTIMA VE SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. ANTEPFISTIĞI HAKKINDA GENEL BİLGİLER	4
2.1.1. <i>Orjini ve Tarihçesi</i>	4
2.1.2. <i>Biyolojisi</i>	6
2.1.3. <i>Ekolojik İstekleri</i>	19
2.1.4. <i>Dünyada ve Türkiye’de Antepfıstığı Yetiştiriciliğinin Bugünkü Durumu</i>	22
2.1.5. <i>Antepfıstığının İnsan Beslenmesindeki Önemi</i>	27
2.1.6. <i>Geleneksel Çoğaltma Metotları</i>	30
2.2. BİTKİ HÜCRE, DOKU VE ORGAN KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ	34
2.3.1. <i>Erkek Antepfıstığı Ağaçlarının Mikroçoğaltılması</i>	36
2.3.2. <i>Besi Ortamının Seçimi</i>	42
2.3.3. <i>Fiziksel Kültür Ortamı</i>	43
2.3.4. <i>Klonal Çoğaltım</i>	44
3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. BİTKİSEL MATERYAL	50
3.1.1. <i>Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri</i>	50
3.2. METOT	51
3.2.1. <i>Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması</i>	51
3.2.3. <i>Sterilizasyon Teknikleri</i>	55
3.2.4. <i>Kültür Şartları</i>	57
3.3. GENEL DEĞERLENDİRME	57
3.3.1. <i>Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları</i>	58
3.3.2. <i>Kültür Başlatılması Çalışmaları</i>	60
3.3.3. <i>Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları</i>	62

3.3.4. Köklendirme Çalışmaları	65
3.3.5. Aklimatizasyon Çalışmaları.....	67
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ (VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ).....	67
4. BULGULAR	69
4.1. OLGUN ERKEK ANTEPFISTIĞI AĞAÇLARINDAN ALINAN SÜRGÜN UÇLARINDAN YÜZEY STERİLİZASYON METODUNUN GELİŞİMİ	70
4.1.1. 25 Yıllık Erkek Antepfıstığı Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'nin Etkisi	71
4.1.2. Eksplantların Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'de Optimum Bekletme Süresinin Tespiti	72
4.1.3. Kültüre Alınan Eksplantların Toksik Maddelerini (Fenolikleri) Adsorbe Etmek İçin Kimyasal Madde Uygulanması.....	73
4.1.4. Kültüre Alınan Eksplantlardan Toksik Madde (Fenolik) Salınmasının Engellenmesine H ₂ O ₂ ve Steril Saf Suda Yıkamanın Etkisi	74
4.2. KÜLTÜR BAŞLATILMASI ÇALIŞMALARI.....	76
4.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi.....	76
4.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokinlerin (BA, Kin) Etkisi.....	77
4.2.3. BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Kültür Başlatılmasına Etkisi.....	78
4.2.4. En İyi Regenerasyon Potansiyeli Zamanının Tespiti.....	80
4.3. SÜRGÜN PROLİFERASYONU ÇALIŞMALARI.....	81
4.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokin (BA, Kin, TDZ) Tiplerinin Etkisi	81
4.3.2. Sürgün Proliferasyonuna Alt Kültürün Etkisi.....	83
4.3.3. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	85
4.3.4. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin (MS, SH, WPM) Etkisi.....	86
4.3.5. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokin Konsantrasyonuna GA ₃ 'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	87
4.3.6. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokin Konsantrasyonuna Oksin Tipinin Etkisi	88
4.3.7. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Konsantrasyonlarının (1/4, 1/2, 1/1, 2/1 MS) Etkisi.....	89
4.3.8. Sürgün Proliferasyonuna Karbohidrat Çeşidinin (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) Etkisi.....	90
4.3.9. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidi (Sakkaroz) Oranlarının Etkisi.....	91
4.3.10. Sürgün Proliferasyonuna Poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) Etkisi.....	93
4.4. KÖKLENDİRME ÇALIŞMALARI	94
4.4.1. Bir Hafta Karanlık Uygulaması Yapılmış Sürgünlerin Köklenmelerine Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi	94
4.4.2. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi.....	95

4.4.3. Sürgünlerin Köklenmelerine En İyi Oksin Tipinin (IBA) Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	95
4.4.4. Kültüre Alınan Sürgünlerin Uzunluklarının Köklenme Üzerine Etkisi.....	97
4.5. AKLİMATİZASYON ÇALIŞMALARI.....	98
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	101
5.1. MATERYALİN STERİLİZASYONU İLE İLGİLİ GENEL DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	101
5.2. KÜLTÜR BAŞLATILMASI İLE İLGİLİ GENEL DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	103
5.3. SÜRGÜN PROLİFERASYONU İLE İLGİLİ GENEL DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	108
5.4. KÖKLENDİRME ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ GENEL DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	110
5.5. AKLİMATİZASYON VE TARLA KOŞULLARINA AKTARMA İLE İLGİLİ GENEL DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA	112
6. İLERİYE YÖNELİK ÇALIŞMALAR.....	114
7. REFERANSLAR.....	117
8. TABLO LİSTESİ	124
9. ŞEKİL LİSTESİ.....	126
10. RESİM LİSTESİ	127
11. ÖZGEÇMİŞ.....	128

AMAÇ

İç ve dış ticaretimizde önemli bir yeri olan Antepfıstığının, ulusal ekonomimize katkısını artırmak için, üstün karakterli varyetelerden kurulmuş meyve bahçeleri gereklidir.

Zararlı ve hastalıklarla yetersiz mücadele, uniform verimli plantasyonlar için teorik yetersizlik, kaliteli seçkin anaç ve kalemlerin kullanılmaması, sulama, gübreleme, budama ve ilaçlama yetersizliği ve hasat sırasında gözlere verilen zararlar, Antepfıstığında verimi etkileyen önemli faktörlerdendir. Antepfıstığı üretiminin artırılması; iri meyve yapılı, yüksek verimi olan, periyodisitesi az olan yada olmayan, yeşil iç renkli çeşitlerle ve uygun ekolojik ve teknik koşulların sağlanması ile oluşturulabilir.

Ülkemiz, özellikle de Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Antepfıstığının en önemli gen merkezlerinden biri olup, bu bölgede (özellikle Gaziantep, Urfa ve Siirt) yüzyıllardır yetiştirilmektedir. Antepfıstığı dioik bir bitkidir. Dış döllenme gösteren bir cins olduğu için tohumdan gelişen her fert genetik olarak değişkendir ve % 50 erkek, % 50 dişi ağaç olma olasılığına sahiptir. Zigotik kökenli tohumlardan yetişen fidelerde açılım söz konusu olduğundan erkek ve dişi ağaçların mutlaka üstün nitelikli kültür varyeteleri ile aşılması gereklidir. Aşılama da görülecek olası uyuşmazlıklardan dolayı ara aşı gerekebilmektedir. Bu da ürün alımında zaman kaybına neden olmaktadır. Bu zaman kaybı Antepfıstığı yetiştiriciliğinin geliştirilmesini etkileyen önemli faktörlerden biridir.

Antepfıstığında verimi etkileyen faktörlerden birisi de erkek ve dişi ağaçların çiçeklenme süreleridir. Antepfıstığında çiçeklenme zamanı, hava sıcaklığına, anaca, ağacın beslenme durumu ve yaşına bağlı olarak değişebilir. Antep fıstıklarınının dişi ve erkek çeşitleri ve türleri arasında tozlaşma bakımından birbirleriyle uyuşmazlık yoktur. Uyuşmazlık olmamakla birlikte erkek ve dişi çiçeklerin farklı zamanda çiçek açması yaygındır. Genellikle erkek ağaçlar dişilerden daha önce çiçek açar ve polen vermeye başlar. Bu da ürün alımında verim kaybına neden olur. Bu nedenle, dişilerle eş zamanlı çiçeklenme zamanına sahip olan uygun erkek tiplerinin çoğaltılması önem taşımaktadır.

Antepfıstığında verim kaybına neden olan içi boş meyve (fis meyve) oluşumu; genellikle bahçedeki erkek ağaç sayısı, erkek ve dişi çiçeklerin aynı

zamanda olgunlaşmaması, erkeklerin zayıf anaç üzerine aşılınması ve farklı iklimsel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkar. Bundan dolayı dişi ağaçlar ile eş zamanlı çiçek açan üstün nitelikli erkek ağaçların klonlanması, tozlaşmanın artmasını sağlayarak fis meyve oluşumunu engelleyecek ve böylece verimin artması mümkün olacaktır. Bilindiği üzere günümüzde fıstık ağaçlarının çoğaltılmasında kullanılan geleneksel metotlar talepleri karşılamada belirgin bir şekilde yetersiz kalmaktadır.

Türkiyede ekonomik olarak sulanabilir 8,5 milyon hektar alanın yaklaşık 1,5 milyon hektarı (yaklaşık % 20'si) GAP bölgesinde bulunmaktadır. Halen bu miktarın yaklaşık 180.000 hektarlık bölümü işletmeye açılmıştır.

GAP'ın sulama projelerinin tamamlanmasıyla 1.5 milyon hektar alanın sulamaya açılması hedeflenmektedir. 2005 yılı itibariyle DSİ tarafından 236 019 hektar alan sulamaya açılmıştır. Fiziki gerçekleştirme açısından, sulama projelerinin % 13.7'si işletmede, % 8.3'ü inşaat halinde, % 21.8'i ihale ve % 56.2'si planlama aşamasındadır (Anonim, 2006a).

Ülkemizin toplam yüzölçümünün % 9.7'sini oluşturan ve yüzölçümü 75.358 kilometre kare olan Güneydoğu Anadolu Bölgemizde, GAP ile birlikte sulu tarım olanaklarının artması sonucu, zeytinden fıstığa, fındıktan narenciyeye kadar geniş yelpazede ürünler yetiştirilebilecektir.

Bu bağlamda yeni Antepfıstığı bahçelerinin kurulması için uygun çeşitlerin hızlı çoğaltımı gerekmektedir. Bu nedenle mevcut çoğaltım teknikleri yeni metotlarla desteklenmelidir. Bitki hücre, doku ve organ kültür teknikleri (organogenezis, embriyogenezis, mikroaşılama), geleneksel metotlara umut verici alternatif bir yaklaşımdır. *Çalışmamızın amacı* üstün özelliklere sahip erkek Antepfıstığı ağaçlarının mikroçoğaltımı için rutin olarak kullanılacak entegre bir protokol geliştirmektir.

ÖZET

Doktora Tezi

Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.cv. "Atlı")

Ağaçlarının Mikroçoğaltılması

Engin TILKAT

Dicle Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

2006, Sayfa 142

Bu çalışmada 25 yıllık olgun erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) cv. 'Atlı' ağaçlarından alınan apikal tomurcuklar kullanılarak bir *in vitro* klonal mikroçoğaltım metodu geliştirildi. Kültüre alınacak olan eksplantların yüzey sterilizasyonu % 10'luk NaOCl içinde 40 dakika boyunca çalkalanarak yapıldı.

Sürgün uçlarından itibaren, kültür başlatılması, sürgün çoğaltılması, rejenere sürgünlerin köklendirilmesi ve köklendirilmiş fidelerin sera koşullarına adaptasyonu için metotlar geliştirildi.

Kültür başlatılması için 6-Benzylaminopurin (BA)'ın mutlaka gerekli olduğu tespit edildi. Sürgün proliferasyonu için test edilen sitokinler (BA, Kin, TDZ) içerisinde 0,5-2.0 mg^l⁻¹ aralığında BA içeren, 5.5 gl⁻¹ agar ve 30 gl⁻¹ sakkaroz içeren, 1/1 konsantrasyonunda MS besi ortamının en iyi sonuç verdiği tespit edildi.

Sürgün proliferasyonuna optimizasyon çalışmalarında tespit edilen en iyi sitokin konsantrasyonuna (0.5-2.0 mg^l⁻¹ BA) oksin, gibberellin ve poliamin ilavesinin olumlu sonuçlar vermediği tespit edildi.

In vitro rejenere edilen sürgünlerin köklendirilme çalışmalarında en iyi oran (% 73), 1.0 mg^l⁻¹ BA içeren MS besi ortamında daha önce 20 kez alt kültürü yapılmış 4 cm uzunluğundaki sürgünlerin 2.0 mg^l⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında kültüre alınmasıyla elde edildi.

Test edilen diğer oksinlerde (IAA, NAA ve 2-4 D) daha düşük köklenme oranları elde edilmiştir. *In vitro* köklendirilen bitkicikler *in vivo* koşullara başarılı bir şekilde (% 95) adapte edildi.

Sonuçlar seçkin Antepfistığı ağaçlarının klonlanma stratejileri açısından tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Erkek Antepfistığı, *in vitro*, mikroçoğaltım

SUMMARY

PhD. Thesis

Micropropagation of Mature-Male Pistachio

(*Pistacia vera* L. cv. Atlı)

Engin TILKAT

Dicle University

Graduated School of Natural and Applied Science

Department of Biology

2006, Page: 142

Methods were developed for the *in vitro* micropropagation of pistachio (*Pistacia vera* L.) cv. 'Atlı' using apical tips from mature (twenty-five year old) trees. Mature shoot tips of 'Atlı' were surface sterilised with a 10% sodium hypochloride (commercial bleach) solution for forty minutes.

Methods were described for the initiation, proliferation, rooting and acclimatisation of mature apical shoot tips. Cytokinin 6-benzyl aminopurine (BA) was found to be essential for the induction of organogenesis from mature apical shoot tips on a 1/1 MS medium. BA at 0.5 - 2.0 mg l⁻¹ gave the best results for the proliferation of cultures from apical shoot tips among the tested cytokinins (BA, Kin, TDZ). Inclusion of auxins, polyamines and gibberellins as applied to the best cytokinin treatment was not effective for further shoot multiplication. The best rooting (73%) of mature male *Pistacia vera* regenerated materials which was previously subcultured twenty times on MS basal medium supplemented with 1.0 mg l⁻¹ BA was achieved with explants (four cm long) on 2.0 mg l⁻¹ IBA containing an MS medium. Lower rooting responses were obtained from the regenerated mature material of *Pistacia vera* L. by using other auxins. *In vitro* rooted shoots of mature *Pistacia vera* materials were successfully acclimatised (95%) *in vivo*.

Results are discussed for cloning strategies of selected male trees.

KEYWORDS: Male pistachio, *in vitro* and micropropagation

KISALTMA VE SİMGELER

MS	: Murashige ve Skoog
WPM	: Woody Plant Medium
SH	: Schenk and Hildebrand Medium
BA	: 6-Benzil adenin
Kin	: Kinetin
NAA	: Naftalen asetik asit
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: Indol bütirik asit
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
TDZ	: Thidiazuron
IPA	: Indol-3-propionik asit
Zea	: Zeatin
GA3	: Gibberellik asit
g	: Gram
g ^l ⁻¹	: Gram / Litre
w/v	: Ağırlık / Hacim
v/v	: Hacim/Hacim
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
mg ^l ⁻¹	: Miligram / Litre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
CaOCl	: Kalsiyum hipoklorit
SA	: Sitrik Asit
l-AA	: l-askorbik asit
MAS	: Marker assisted selection

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat Markers
SSR	: Simple Sequence Repeat Markers
SCAR	: Sequence-Characterized Amplified Regions
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
QTL	: Quantitative Trait Locus

1. GİRİŞ

Tarımsal üretimin geçmişi düşünüldüğünde, devrim olarak adlandırılan iki önemli dönem mevcuttur. Bunlardan birincisi, üstün varyetelerin elde edilmesi, ticari gübreler ve ileri tarımsal tekniklerin uygulanmasıyla ortaya çıkan yeşil devrim (green revolution), diğeri de özellikle son 20 yılda etkisi gittikçe artan ve bitki biyoteknolojisinin uygulanmasıyla ortaya çıkan gen devrimi (gene revolution)'dir.

Yeşil devrimde üretim tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleştirilmiş, DNA'nın yapısının anlaşılması, bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devrimi döneminin başlamasını hızlandırmıştır (Babaoğlu ve ark., 2002).

Çalışmalarımızı da kapsayan bitki doku kültürü tekniklerinde kullanılan temel nokta bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücre veya dokuların özellikleri bakımından;

Organize olmuş meristematik dokuları içeren somatik dokulardan rejenerasyon,

Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon,

Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon,

olmak üzere üç farklı kısımda incelenir. Çalışmalarımızda da kullandığımız birinci tip rejenerasyona, meristematik dokular içeren apikal ve lateral uç kültürü yoluyla klonal çoğaltım da denilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahında kullanılan başlıca uygulama alanları arasında; türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürleri, haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürleri, somaklonal varyasyonlar, *in vitro* seleksiyonlar, germplazm muhafazaları, somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu) ve gen transferleri ile hastaliksız bitki eldesinde meristem kültürleri, mikroçoğaltım, sentetik tohum (somatik embriyolar) üretimi, kallus-hücre süspansiyonlarıyla sekonder metabolit üretimi ve kimerik bitki oluşturmak sayılabilir.

Genetik olarak değiştirilmiş 70'ten fazla bitki türünün hepsinde bir takım doku kültürü teknikleri uygulanmıştır (Brown and Thorpe, 1995). Modern tarımda

en fazla 150 bitki türünün tarımının yapıldığı ve bunların iyileştirilmesinde klasik yöntemlerin sınırına geldiği düşünülürse, bitki doku kültürü tekniklerinin süratle geliştirilmesinin ve uygulanmasının önemi daha iyi anlaşılır. Bitki doku kültürünün en önemli etkisi ve uygulama alanı, mikroçoğaltımda hatta bundan daha önemlisi bitkilerin hücre seviyesinde kontrollü manipülasyonunda olacaktır. Bunlar soğuğa, kuraklığa, tuza, ağır metallere, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklılıktır.

Bitki Biyoteknolojisi alanına da giren ıslah çalışmalarında çoğunlukla verim artırma yolları aranmıştır. Ancak geleneksel ıslah çalışmaları, biyoteknolojik yöntemlerle desteklenmedikçe uzun ve beraberinde birçok sorun barındıran sancılı bir süreçtir. Bitki hücre ve doku kültür teknikleri, son yıllarda ülkemizde de daha fazla kullanılmaya başlanan DNA markörleri yardımıyla seleksiyon (MAS) teknikleri, AFLP, RAPD, ISSR, SSR ve SCAR gibi polimorfizm tespitlerinde kullanılan moleküler teknikler, DNA'yı istediğimiz miktarda çoğaltabilmemize ve üzerlerinde sayısız manipülasyonlar yapabilmemize olanak veren RT-PCR ile QTL gibi birçok ileri moleküler tekniklerin de klasik ıslah çalışmalarının yanında yer alması ıslah çalışmalarına son derece güçlü bir ivme kazandırmıştır.

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Ortadoğu, Akdeniz ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletlerinin yarı kurak bölgelerinde yaygın olarak kültüre alınan bir kültür bitkisidir. Fıstık ağaçları yazları ılık ve kışları soğuk olmak üzere çok özel iklimsel şartlara ihtiyaç duyan bir bitki türüdür.

Türkiye, elverişsiz toprak şartlarını ekonomik kazanca çevirebilen bu çok değerli meyve türünden henüz gereği gibi yararlanamamaktadır. İran ve özellikle ABD sulu koşullarda ve en iyi bakım şartlarında Antepfıstığı yetiştirirken, Türkiye'de bu tip plantasyonlar çok sınırlıdır. Sulama imkânlarının geliştirilmesi ile bu yönde büyük bir atılım yapılabilir.

Bu bağlamda, GAP Bölgesi ürün çeşitliliği tahminlerine göre, bölgede Antepfıstığına çok geniş plantasyonlar ayrılması mümkün görülmektedir. Bu durum hayata geçirildiğinde, modern yetiştirme teknikleri ve ıslah edilmiş süper çeşit ve anaçların da kullanımı ile mevcut durum katlanarak gelişecektir.

Türkiye, Antepfıstığı konusunda sahip olduğu potansiyel gücü, ekonomik, sosyal ve çevresel kazançlara dönüştürme bakımından oldukça şanslı görülmektedir. Çünkü ilgili kesimler, bu ürünün ne kadar değerli olduğu ve rakip ülkelerin nasıl çalıştığı hakkında belirli bir bilinç düzeyine gelmiş olup, ciddi bir atılım için hazır görünmektedirler. Bu faydaların gerçekleşmesi için sınırlandırıcı faktörler, ekonomik darboğazlar yüzünden sulanan alanların yeterince hızlı artmaması ve araştırma geliştirme hizmetlerinin yetersiz kalması olabilir.

Antepfıstığı ve mamülleri hakkındaki gelişmelerin gerçekleştirilmesi için yeterli araştırma geliştirme kapasitesi henüz sağlanabilmiş değildir. Halen ülke genelinde bu konuda çalışan bilim adamı sayısı çok sınırlıdır. Bunların da tamamı yalnızca Antepfıstığı konusunda çalışmamakta, başka sorumluluklar üstlenmektedir. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, ilgili bütün disiplinleri kapsayamamakta, başka kuruluşlarla yapılan işbirliği ise, her zaman yeterli olmamaktadır.

Ancak İran'ın sulama potansiyelinin sonuna gelmesine karşılık, Türkiye'nin henüz kullanmadığı büyük bir sulu Antepfıstığı yetiştirme potansiyeli vardır. Ayrıca, yeni kurulacak bu bahçelerde, İran orijinli fıstıkların doğrudan kullanılması ile verim, büyüklük ve çıtlama konusundaki acil sorun çözülürken, orta vadede, yerli fıstıkların üstün kalite özellikleri, erken meyveye başlama, büyüklük ve yüksek çıtlama gibi mutlak gerekli ticari özelliklerle birleştirilebilir ve böylece İran ve ABD'ye karşı mukayeseli bir avantaj elde edilebilir. Tüketicilerdeki bilinçlenme düzeyi yükseldikçe, İran fıstığının üretim ve işlenmesi sırasındaki bazı hijyenik yetersizlikler daha çok sorgulanacağından, yalnızca ucuz olma, pazar payının muhafazasına yetmeyecektir. Türkiye'nin de kendi teknolojilerini hızla modernize etmesi koşuluyla, bu bir fırsata dönüştürülebilecektir.

Bu bakımdan, ticari öneme sahip bu kültür bitkimizin yetiştirme başarıları konusunda ülkemize getireceği faydalar göz önüne alındığında klasik ıslah metotlarının yeni metot ve tekniklerle desteklenmesinin önemi ve gerekliliği net bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Antepfıstığı Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Orjini ve Tarihçesi

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) anavatanı Ortadoğu olan, *Pistacia* cinsinin 11 türünü içeren *Anacardiaceae* familyasının bir üyesidir (Zohary 1952). Antepfıstığı İran, Irak, Suriye ve Türkiye'yi de içeren Doğu Akdeniz ülkeleri, Amerika Birleşik Devletleri, Çin ve Avustralya'nın sıcak ve kurak alanlarında yaygınca yetiştirilen ve gittikçe artan ekonomik değere sahip bir bitki türüdür.

Antepfıstığı kuzey ve güney yarı kürelerinin 30-45° paralellerinin uygun iklimlerinde yetişmektedir. Ülkemizde Antepfıstığının yetiştirildiği yerler, başta Gaziantep olmak üzere Şanlıurfa, Kahramanmaraş, Adıyaman, Malatya, Diyarbakır ile Siirt illerimizdir. Ticarete Antepfıstığı meyveleri çatlak oranı, büyüklüğü ve çekirdek (meyve) rengine göre sınıflandırılır (Ayfer 1990).

Antepfıstığının orjini günümüz yüzyılının başlarına kadar bilinmiyordu. Vavilov'a göre (1951) fıstığın orjini, (1) Hindistan'ın kuzeydoğusu, Afganistan, Tacikistan ve Özbekistan'ı kapsayan Orta Asya ve (2) Asya'nın çok az bölümünü oluşturan ve Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ın dağlık bölgelerinden oluşan yakındoğudur.

Ülkemiz yakındoğu gen merkezi içerisinde yer almaktadır. Son istatistiklere göre Antepfıstığı yetiştiriciliği 56 ilimize yayılmıştır. Ancak, üretimimizin % 94'ünü Güneydoğu Anadolu Bölgesi oluşturmaktadır. Bu bölgemiz, Antepfıstığının gen merkezi ve ilk kez kültüre alınan yer olması yanında, sahip olduğu kendine özgü ekolojik özellikleri nedeniyle, bu meyve türünün başarılı bir şekilde yetişmesine ve yayılmasına öncülük etmiştir.

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın kültüre alınışı çok eskilere dayanmaktadır. Konu ile ilgili literatürler, bu ürünümüzün Güneydoğu Anadolu'ya yerleşen Etiler tarafından kültüre alındığını, o çağlarda kral sofralarına girdiğini, dolayısıyla çok eskilerden beri kültür çeşitlerinin bulunduğunu ve meyve değerinin bilindiğini belirtmektedirler.

Bununla beraber son arkeolojik bulgular Türkiye, Ürdün, Suriye, Irak ve İran'da M.Ö. 7000 yıllarında fıstığın gıda olarak kullanıldığını ortaya koymuştur (Kirkbride, 1966, Bender, 1975, Kramer, 1982, De Conteson, 1983).

Arkeologlar fıstığın Irak'ın kuzeydoğu bölgesindeki Jarmo bölgesinde M.Ö. 6750 yıllarında yaygın olarak tüketildiğine dair bulgulara rastlamışlardır.

Belçika kraliçesi Sheba, Asur devletine yaptığı ziyaret esnasında az miktardaki fıstığa özel kullanım için el koymuştu ve sadece meşhur imparatorluk sarayının bahçesinde yetişen fıstık ağaçları, o dönem için aslında seçkinliğin ve imtiyazlığın bir simgesiydi (Whitehouse, 1957). Fıstık ağaçları M.Ö. 8. yy. civarlarında Babil Kralı Meradoch-Boledan'ın bahçesinde de ekiliydi (Brothwell ve Brothwell, 1969). M.Ö. 2. yy.'da Niconder şimdiki Irak sınırına yakın, İran'ın güneybatısında bir köy olan Susa'da fıstık ağaçları bulmuştur (Joret, 1976). M.S. 1. yy.'da Poseidon'lular Suriye'de yetiştirilmiş fıstıkları kayıtlara geçirmiştir ki bu da Romalı ve Yunanlı yazarları yanıltarak fıstığın orijin merkezinin Suriye olduğunu düşündürmüştür (Joret, 1976). Fıstık ağaçlarının Avrupa'ya gelişi Hristiyanlığın başlangıç tarihleriyle aynı zamana denk gelir (Moldenke ve Alma, 1952). M.S. 1. yy.'da Filistin'de yetiştirilen varyeteler, Anadolu'dan Suriye'ye ve Suriye'den de İtalya ya aktarıldı ve bu tarihlerde Roma imparatoru Vitellius tarafından Roma'da tanıtıldı. Fıstık daha sonra İtalya ve Fransa'dan, İspanya'ya ve 1853-1854'te ise ABD'ye aktarıldı. Fıstığın İspanya'ya geliş yollarından birisi de Araplar vasıtası ile dir. Ortaçağ'da İspanya'da Endülüs Devleti'ni kuran Araplar, fıstık tohumlarını ve ağaçlarını da İspanya'nın güneyine ve Sicilya'ya aktardılar. Fıstığın Amerika'ya getirilişi 1854 yılında bir tohum distribütörü olan Charles Mason tarafından gerçekleştirildi.

Fıstık tarımı, ana merkezi orta doğudan, doğuya doğru da yayıldı ve M.S. 10. yy.'da İran'dan ipek yolu vasıtasıyla Çin ve çevresinde yaygınlaştı (Lemaister, 1959). Son zamanlarda ise Avustralya'da üreilmeye başlandı. Fıstık ismi eski Pers dili olan Zendor Aveston'daki "pista-pistak"tan türetilmiştir. Dioskurides'e göre Latin sözcüğü pistachio sakız, reçine anlamında olan "pissa" ve iyileştirme anlamında olan "aklomaı" den türetilmiştir. Genellikle Fıstık Araplar tarafından Gatoum diye adlandırılan Yakub'un fındıkları olarak bilinir (Moldenke ve Alma, 1952).

1854 yılında Charles Mason tarafından Kaliforniya, Teksas ve diğer güney bölgelerde kültür çalışmalarını başlatmak için tohum dağıtılmıştır. 1875 yılında az sayıda fıstık ağacı Sonoma'da dikilmek için Fransa'dan getirilmiştir. 1900'lü

yılların başlarında Amerikan hükümeti Kaliforniya Chico’da değişik Antepfıstığı türleri ve farklı fıstık türlerinin kültürünü başlattı ve burada büyük bir bitki üretim deney istasyonu kurdu. Ticari Antepfıstığı üretimi ise 1970 yıllarında özellikle Kaliforniya’nın San Joaquin vadisinde başlamıştır (Anonim, 2006b).

Ülkemizde ise ticari Antepfıstığı üretiminin yakın tarihine bakacak olursak; ilk olarak 1937 yılında “fıstık istasyonu” adıyla kurulmuş olan *Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü* ve daha sonra ise 1943 yılında kurulan *Ceylanpınar Tarım İşletmesi Müdürlüğü*’nde Antepfıstığının üretimi ve plantasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

2.1.2. Biyolojisi

2.1.2.1. Ağaç Özelliği

Antepfıstığı hem mahun cevizi (cashew) hem de mangonun akrabası bir bitkidir. Yapraklarını her yıl döken dioik bir bitkidir. Genellikle rüzgarla tozlaşır. Erkek ağaçlar sadece polen üretir. Dişi ağaçlar ise meyveyi oluşturur. Diğer meyve ağaçları gibi Antepfıstığı da bir yıl çok, diğer yıl ise daha az ürün verir. Antepfıstığı ağaçları oldukça yavaş gelişir. Bahçelerin kurulmasında 7 - 10 yıl sonra verimli ürün alınmaya başlarken yoğun üretime 20 yıl civarında ulaşılır. Fıstık üretiminde iklim oldukça önemlidir. Yumuşak bir kış veya tozlaşma periyodunda yoğun yağmur olması verimi azaltabilir. Antepfıstığı ağaçları değişik anaçlar üzerinde yetişir. Kontrollü koşullarda yetiştirilen anaçlar bir yılda aşı kalınlığına ulaşır. Anaç kullanılmasının nedeni daha sağlıklı ve daha iyi bir gelişmeye olanak sağlamalarıdır. Antepfıstığı Ortadoğu, Avrupa ve Asya’da birçok ülkede yüzyıllardır üretilmesine rağmen bugün özellikle Amerika’da önemli bir ticari ürün olmuştur. Bunun da nedeni tek bir tip dişi ve erkek çeşidin kullanılmasıdır.

Antepfıstığı yazları uzun, sıcak, kurak ve kışları nisbeten soğuk olan bölgelerde ekonomik olarak yetişebilmektedir. Antepfıstığının yetişme alanlarını belirleyen önemli faktörlerden birisi sıcaklıktır. Yaz aylarında meyvenin gelişmesi ve olgunlaşması için, oldukça fazla ve uzun süre yüksek sıcaklık, kış aylarında ise belli bir süre düşük sıcaklığa ihtiyaç gösterir. Ancak kış soğuklarının -15 °C ve

daha fazla düşme ihtimalinin olduğu alanlarda meyve gözlerinde zararlanma olabilir.

Antepfıstığı ağaçları 10 metreye kadar büyüyebilir. Genç yaprakların tüylü, olgun yaprakların ise loblu olmasıyla bileşik pinnatlardan ayrılır. Dış taraflarında elle veya mekanik etkiyle meyve olgunlaşınca ayrılabilen etli kabuk bulunur. Ticari Antepfıstığı yetiştiriciliği çok özel bir iklim gerektirir. Bu ağaçların, yazın 98-110 gün boyunca 30 °C ve üstü, soğuk kış günlerinde ise en az 1000 saat 7°C ve altındaki sıcaklıkta soğuklamaya ihtiyaçları vardır. Bu nedenle dünyada fıstık yetiştiriciliği yapılan yerler sınırlıdır. Dünyadaki ticari fıstık üretimi 1977'de 107.000 tondan, 2005 yılında 992.000 tona yükselerek 9 kat artmıştır (Kaliforniya Fıstık komisyonu, Web sitesi). İran, Suriye, Türkiye ve Yunanistan'daki artış sırasıyla; 9.4, 11.2, 3.3 ve 5.8 kat artış olarak gerçekleşmişken Amerika Birleşik Devletlerindeki üretim 1978 de önemsenmeyecek bir miktardan yaklaşık 62 kat artarak 2005 yılında 282.400 metrik tona (Mt.) ulaşmış A.B.D.'ni İran'ın ardından dünyanın en büyük üreticisi haline getirmiştir (Kaliforniya Fıstık komisyonu, Web sitesi).

Anacardiaceae familyasına giren *Pistacia* cinsinin meyve ağacı ve süs bitkisi olarak değer kazanan 11 türü vardır (Özbek, 1978). Bu türler arasında gruplama yapılırken yaprak, çiçek, meyve ve gelişme durumları dikkate alınmaktadır. *Pistacia* türlerinde yapraklar bileşiktir. Bir yapraktaki yaprakçık sayısı 1-20 arasında değişebilmektedir.

Kısa boylu bir ağaç olan Antepfıstığının, beş yaprakçıktan oluşan yeşil yaprakları, salkımlar halinde açan küçük çiçekleri vardır. Bu çiçekler olgunlaştığında, 2-2,5 cm uzunlukta, dışında kırmızimsı ve yumuşak bir kabuğu, bunun içinde sert kabuğu olan ve bunun içinde de yeşil ya da sarı renkli tohum bulunan bir meyve verir.

Antepfıstığı meyveleri temmuz ayında gelişir. Gelişen meyve dış kısmındaki kabukta doğal olarak gelişen bir çatlak oluşmasına neden olur. Meyveler olgunlaştığında, en dış kısmındaki etli tabaka elle sıkıldığında kolayca ayrılır. İyice olgunlaşan meyveler kırmızimsı renge döner. Meyvelerin toplanması doğal olarak gelişecek çatlağın oluşması açısından çok önemlidir. Genelde ağustos sonu ya da eylül ayı başında meyveler toplanır. Antepfıstığı meyveleri

genelde ağaçlar sallanarak ya da elle toplanır. Amerika ve Avustralya'da ise mekanik olarak ürün toplama yapılabilmektedir. Ürünler toplandıktan sonra en dış kısımdaki etli bölüm en kısa zamanda (24 saat içinde) meyveden uzaklaştırılmalıdır. Aksi takdirde bu etli tabaka nemi emerek, kabuğun boyanmasına ve aflatoksin oluşumuna yada kontaminasyona neden olur. Meyvenin dış kısmındaki tabaka plastik bir torbada meyveler karıştırılarak uzaklaştırılabilir.

Fıstığın sert kabuğu, kavrulduğunda ya da üzerine sert bir cisimle vurulduğunda çatlar. Elle zorlanan çatlak kabuk ikiye ayrılır. Uzun süre saklanabilen Antepfıstığının içi kuruyemiş (çerez) olarak sevilerek yenildiği gibi şekerlikte, pastacılıkta, helvacılıkta ve tatlıcılıkta (özellikle baklava yapımında) kullanılmaktadır.

Antepfıstığı kuvvetli kök yapısı nedeniyle başka hiçbir bitkinin yetişemeyeceği sahalarda yaşayabilmekte, hatta ürün de verebilmektedir. Antepfıstığının bu özelliği, bazı yanlış düşüncelere yol açmaktadır. Halk arasında "Antepfıstığı, mutlaka kötü karakterli topraklara dikilir" gibi yanlış bir anlayış vardır. Halbuki bütün meyve türlerinde olduğu gibi Antepfıstığı da nisbeten derin, süzek, tınlı ve kısmen kireçli toprakları sevmektedir. Dikilen fidanın çabuk gelişmesi, erken meyveye yatması, bol ve düzenli ürün verebilmesi için, toprak şartlarının istenilen nitelikte olması ve bakım işlerinin iyi yapılması gerekir.

2.1.2.2. Yaprak Özelliği

Yapraklar her yıl dökülür, çok nadiren trifolyat ya da basit yapıdadırlar. Trifolyat ya da imparipennat olan yapraklar büyük 1-2 çift, yumurtamsı veya geniş mızraksı, 5-10 cm boyunda, 3-6 cm eninde ağsı damarlıdır. Terminal (uç) yaprakçık kesin olarak vardır. Terminal yaprakçık yandakiler kadar ya da biraz büyük olabilir. Bazı yabancı fıstık türleri büyük ve gösterişli yapraklarından dolayı Amerika'da yol boylarında süs bitkisi olarak yetiştirilir.

Yapraklar sürgün uçlarında tekli olabileceği gibi, genellikle 1-2, bazen de 3 çift yapraklıdır. Yaprakçık sapında kanat (brakte) bulunmaz. Yaprakları koyu yeşil renkli, üst yüzeyleri parlak, alt yüzeyleri ise mattır.

Yaprakçıklar, dişi Antepfıstığı ağaçlarında ovale yakın, erkek Antepfıstığı ağaçlarında ise, enleri daralmış, sivri uçlu, hiçbir zaman öteki *Pistacia* türlerinde olduğu kadar dar yapılı değildir (Bilgen, 1973).

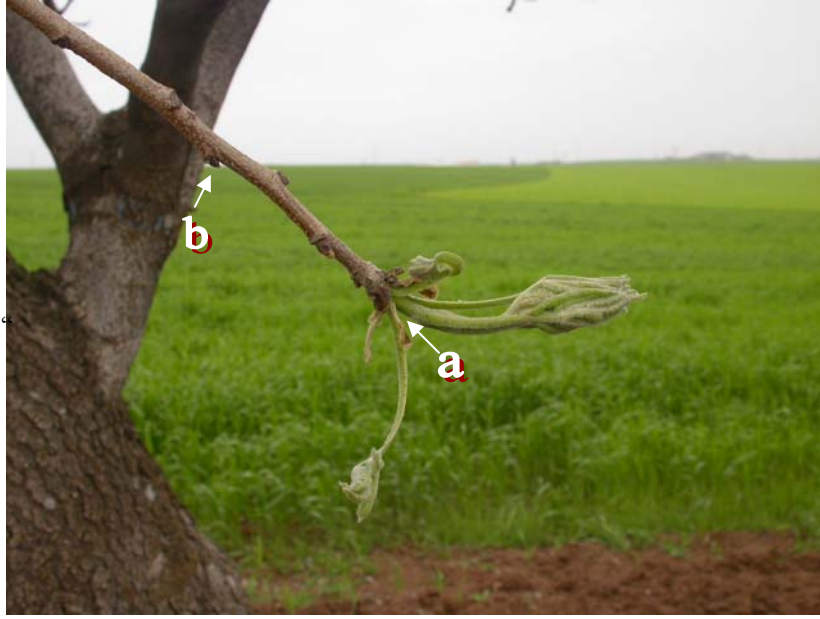
2.1.2.3. Çiçek Özelliği:

Çiçekler salkım şeklinde taç yaprakları olmayan, yeşilimsi sarı renklidir.

Yüzlerce kendine özgü çiçek içeren, hem erkek hem de dişi çiçeklenmeler aniden gerçekleşir. Çiçek durumu Panikuladır. Çiçeklerin her iki tipi (erkek ve dişi) de apetaldir ve tozlaşma rüzgarla olur. Erkek türlerin erken çiçeklenmesi (proteandri) yaygın görülen bir durumdur.

Çiçek tomurcukları bir önceki takvim yılında ayırt edilebilir şekilde oluşurlar (Ayfer, 1963). Filiz uzaması Mart ayının sonunda başlar ve Nisan sonu ile Mayıs ortalarında son bulur (Crane ve Iwakiri, 1981).

Genellikle büyüme ve çiçeklenmenin olduğu dallarda en tepede bir apikal (uç), bir ya da iki aksillar (yan) tomurcuk bulunur (Resim 1). Apikal ve özellikle lateral tomurcuklar, çiçek tomurcuklarından oldukça küçüktürler ve lateral tomurcuklar muhtemelen takip eden yılda ya da dormansi kalktığında lateral dal olarak gelişirler. Çiçek tomurcukları mart ayının sonuna doğru açılmaya başlar ve genellikle mayıs ayının sonlarında anthesis meydana gelir. Yaklaşık üç hafta sonra büyümeleri ve farklılaşmaları hızlanır (Ayfer, 1963). Yani Antepfıstığı ağaçları bir önceki yılda gelişen dalda meyvesini verir (Crane, 1984).



Resim 1. (a) Apikal ve (b) Lateral Tomurcuklar

2.1.2.3.1 Dişi Çiçek

Çok küçük olan Antepfıstığı dişi çiçekleri, çok kısa sapları ve bunların dibindeki birer brakte ile, birkaç tanesi bir arada olarak, salkım üzerinde yer alırlar (Resim 2).



Resim 2. Dişi Çiçek

Dişi çiçekler 2-3 mm.den küçüktür. Dişicik borusu (Stilus) kısadır. Dişicik tepesi (Stigma) ise çiçek tozlarını tutacak şekilde pürüzlü ve üç parçalıdır. Tepeciğın alanı yaklaşık 3 mm²'dir (Kaşka ve ark., 1989).

Yumurtalık meyvenin şekline uygun olarak elips, yumurta biçiminde veya yuvarlaktır. Kuru (1984), tohum taslağının anatrof ve tek integumentli olduğunu belirtirken, Polito ve Luza (1989), iki integumentli olduğunu bildirmişlerdir.

Antepfıstığının erkek ve dişi çiçeklerinde taç yaprakları bulunmamaktadır. Bu nedenle çiçeklenmenin başlangıcını ve bitişini tespit etmek güç olmaktadır. Erkek ağaçlarda 10-15 salkımda erkek organ başçıklarının (anter) patlamaya başladığı, dişi ağaçlarda ise salkım üzerindeki çiçeklerin % 5'nin krem renge dönüştüğü veya diğerlerine göre biraz daha koyulaştığı tarih, çiçeklenme başlangıcı ve dişi çiçeklerin % 75'inin krem yeşil renge dönüştüğü tarih ise tam çiçeklenme olarak kabul edilmektedir. Öte yandan erkek ağaçlarda anterlerin yaklaşık hepsinin patladığı, dişi organların (pistil) yaklaşık % 90'ının renginin yeşile dönüştüğü tarih çiçeklenme sonu olarak kabul edilmektedir.

2.1.2.3.2 Erkek Çiçek

Dişi çiçeklerle aynı şekilde Antepfıstığı erkek çiçekleri de çok küçüktürler ve çok kısa saplarla salkımlara bağlanmışlardır (Resim 3). Erkek çiçek salkımlarında 200-600 arasında değişen sayıda çiçek vardır (Atlı ve ark., 1994). Bir erkek çiçeğin genel olarak morfolojisine bakıldığında, yaklaşık 5-6 erkek organ içerdiği, filamentlerinin çok kısa olduğu, anterlerin dörder bölmeli ve çok sayıda çiçek tozu içerdiği görülür (Bilgen, 1973; Özbek, 1978; Kuru, 1984).



Resim 3. Erkek Çiçek

2.1.2.4 Döllenme Biyolojisi

Antepfıstığının erkek ve dişi çiçekleri ayrı ayrı ağaçlar üzerinde bulunur. Antepfıstığında meyvenin yenilen kısmı tohumu olduğundan, meyve eldesi için tozlaşma ve döllenme zorunludur. Döllenmeyen çiçekler dökülür veya bunlardan içi boş (fis) meyveler meydana gelir, dolayısıyla verim doğrudan etkilenir. Döllenme yetersizliğinin birçok nedeni olmakla birlikte, en önemli neden, çiçek tozu yetersizliğidir. Neticede Antepfıstığı bahçelerimizde çiçek ve küçük meyve dökümleri sık sık görülmekte ve üreticilerimiz zarara uğramaktadır. Normal bir dişi Antepfıstığı çiçek salkımında çeşide göre değişmekle birlikte, ortalama olarak 80-130 adet çiçek bulunur (Bilgen, 1973; Özbek, 1978) (Resim 4).



Resim 4. Dişi çiçek salkımı

Bunun 20 tanesi meyve bağlarsa, bu orta derecede bir verime karşı gelir. Şayet salkımda 40 tane meyve olmuşsa, bu da oldukça yüksek mahsul demektir. Halbuki salkım seyrelmesi gösteren meyve salkımlarında, 1-6 meyve kalmaktadır. Tüm bunların en önemli nedeni, üreticilerimizin bahçelerine erkek ağaç dikmemeleridir. Antepfıstığı bahçelerinde genel olarak, 8-11 dişi ağaca 1 erkek ağaç hesaplanmalıdır. Erkek ağaçlar ürün vermediğinden, üreticilerimiz bunlara bahçelerinde yer vermemekte veya çok az yer vermektedirler. Üreticilerimiz bahçelerindeki erkek ağaçlara kayıp değil kazanç gözüyle baktıkları taktirde yukarıda anlatılan çiçek ve meyve dökümleri olmayacaktır. Aksi taktirde bu dökümler, her ürün yılında kaçınılmazdır.

Bahçede bulundurulması gereken erkekler; büyük taç oluşturmali, periyodisite göstermemeli, çiçeklenme süresi uzun ve dişilerin çiçeklenmesiyle uyuşma süresi yüksek olmalı, çiçek tozları bol ve çimlenme yüzdesi yüksek olmalıdır (Atlı H.S., 1992).

Ülkemizde Antepfıstıkları mart sonu veya nisan başlarında uyanmakta, genellikle nisan ayının ilk yarısında çiçek açmaktadır. Bu dönemdeki düşük sıcaklıklar çiçeklere ve genç yapraklara büyük zarar verebilmektedir. Yeni bahçe tesis edilirken, özellikle soğuk hava akımının olduğu yerlerde bahçe kurulmamalıdır. Çiçeklenme periyodunda uzun süre devam eden serin ve yağışlı hava, erkek ağaçların çiçek tozlarının yayılmasını olumsuz etkilemektedir.

Ayfer (1959), yaptığı çalışmalarda farklı erkek tiplerin dölleme önem teşkil eden bazı özelliklerini belirtmiştir. Yapılan araştırmada, melengiç, buttum ve melez tipler gibi yabancı *Pistacia*'larda erkek çiçeklerin dişilerden daha erken olgunlaşmalarının *Pistacia vera* L.'de olduğu kadar bariz olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca *P. vera* dişilerinin çiçeklenme süresi ortalamasının, öteki *Pistacia* türleri erkeklerinin ortalamasından uzun olduğundan bahsedilmektedir. Ortalama çiçeklenme süresinin *P.vera*'nın dişi ağaçlarında 11 gün, erkek ağaçlarında 9.3 gün olduğunu saptamıştır. Ancak araştırmacı erkek tipler arasında çok büyük farklılıklar olduğunu da bildirmiştir.

Öte yandan Kuru (1984), çiçeklenme süresinin erkek ağaçlarda, yıllara göre değişmekle birlikte, 5.16 - 8.10 gün arasında olduğunu, dişi ağaçlarda ise yine yıllara göre 11.23 - 12.07 gün arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Antepfıstığı erkekleri çok fazla miktarda çiçek tozu oluşturmaktadır. Bununla birlikte bahçe kurarken erkek ağaçların değişik yerlere dikilmesi gerekmektedir (Crane, 1974; Opitz, 1975; Özbek, 1978; Crane ve Maranto; 1989; Kaşka ve ark, 1989).

Çiçeklerin farklı zamanda açılmasının derecesi, çeşit yada tipin genetik yapısına, mevsimsel olarak hava sıcaklığına, ağacın beslenme durumuna, yaşına vb. etmenlere bağlı olduğu gibi (Crane, 1937; Ayfer, 1959; Bilgen, 2001), dişi ağaçların soğuklanma gereksinimlerinin erkeklere oranla daha uzun olması ile de ilgilidir (Procopiu, 1973).

Bu konuda özellikle sıcaklığın çok önemli rol oynadığını belirten Ayfer (1959), uzun ve serin bir ilkbahardan sonra havaların birden ısınmasının proteandriyi azalttığını ve erkek ile dişi çiçeklerin açılma zamanının denk geldiğini bildirmiştir.

Crane (1974), Crane ve Forde (1974), *Pistacia atlantica*'nın genel olarak Antepfıstıklarından biraz önce çiçek açtıklarını ve tozlanma zamanının birbirlerine denk geldiğini, böylece açık tozlanma ile hibrit bireyler oluştuğunu bildirmektedirler.

Magss (1977), Antepfıstığı bahçesi içinde erkek ağaçtan uzaklaştıkça havada bulunan çiçek tozu yoğunluğunun azalma durumunu araştırmıştır. Araştırmacı havada bulunan çiçek tozu yoğunluğunun azalma durumunu

araştırmıştır. Araştırmacı havada, saat 10:25 ve 13:50 arasında ağaçtan 2 m uzaklıkta 26.1, 6 m uzaklıkta 3.3 ve 26 m uzaklıkta 0.3 adet çiçek tozu/ mm²/saat bulunduğunu saptamıştır.

2.1.2.4.1. Çiçeklenme ve Döllenmede Erkek Ağaçların Önemi

Antepfistıklarında tozlanma rüzgarla olur. Erkek ve dişi çiçekler ayrı ağaçlar üzerinde bulunduğundan, bahçede belirli oranda erkek ağaca gerek vardır. Erkek ağacın görevi, dağıttığı çiçek tozları ile dişi çiçekleri dölmektir. Erkek ağaçların başka bir görevi yoktur. Yani erkek ağaçlar meyve vermez. Bu nedenle üreticilerimiz, meyve vermeyen bu erkek ağaçlara, mümkün olduğu kadar bahçesinde yer vermek istememektedir. Bir başka ifade ile üretici, bahçesinde erkek ağaca ne kadar az yer verirse kendisini o kadar karlı zannetmektedir. Bu düşünce nedeni ile gerek yabancı sahalarda aşılama sırasında, gerekse yeni kurulan tesislerde, aşılama tamamen dişi çeşitlere yapılmaktadır. Örneğin fıstık bölgesi dışında 600 ağaçlık fıstıklık tesis etmek isteyen bir girişimcinin bahçesinde ortalama $600 / 8 = 75$ adet erkek ağaca yer vermesi gerekmektedir. Ancak, bahçesinde bu oranda erkek ağaca yer veren bir üretici ile karşılaşmak, neredeyse imkansızdır. Herkes “Ben bahçeme erkek dikmeyeyim, komşum diksin, onun bahçesindeki erkeklerden istifade edeyim” düşüncesinde olduğundan, tamamen fıstık üretimi yapılan bir köyde, tek bir erkek ağaca bile rastlamak bazen mümkün olmayabilmektedir. Bu durumdan tozlanma ve döllenme olumsuz yönde etkilendiğinden, verimde büyük kayıplar ortaya çıkmaktadır.

Bu konuda erkeğin yararlı olduğunu düşünen bir kısım üreticiler de belli oranda erkeğe yer ayırma yerine, bazı dişi ağaçların birer dalına erkek aşılama tercih etmektedirler. Bu şekilde aşılamalarda erkekler, dişilerden daha hızlı büyüdüklerinden, ağaçta birden fazla taç ortaya çıkmaktadır. Hatta bu durumda hızlı gelişen erkek dalın, dişi dallardaki gelişmeye baskın çıkarak, onları geri duruma düşürdüğü sıkça rastlanmaktadır. Bu konudaki bir başka görüş te, dişi ağacın bir dalına erkek aşı yapıldığında, dişi ve erkek çiçeklerin çiçeklenme devrelerinin uyduğu, yani protandrinin ortadan kalktığı şeklindedir ki, bu da doğru değildir. Çünkü aşılamalardan sonra ortaya çıkacak karakterler, anaçtan çok kalemin etkisindedir.

Erkek aşılamalarda dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan birisi de, çiçeklenme zamanı esen hakim rüzgarın yönüdür. Bahçe tesisinde erkek ağaçların yerleri, rüzgarın erkek ağaçlardan çiçek tozlarını dişilere ulaştırabileceği şekilde seçilmelidir. Bunun gibi aynı ağacın bir dalına yapılacak aşılamalarda da erkek aşılar, ağaçta rüzgarın geldiği taraftaki dala yapılmalıdır (Ak, 2001).

Erkek ağaçlarda da dişiler gibi periyodisite gösterenlerle karşılaşmaktadır. Yine erkekler arasında çiçek tozu nitelikleri ve içli meyve tutumuna etkileri bakımından da farklılıklar vardır. Bahçelerde bu nitelikler bakımından en üstün olanlara yer verilmektedir. Örneğin kara sakızların babalık nitelikleri iyi değildir ve bunların erkek tip olarak bahçede bırakılması faydasızdır.

2.1.2.4.2. Dişilerle Aynı Zamanda Olgunlaşan Erkeklerin Önemi

Bazen her türlü kültürel önlemlerin alındığı ve yeteri kadar erkek ağacın bulunduğu bazı bahçelerde fazla miktarda çiçek ve küçük meyve dökümünün olduğu gözlenmektedir. Fıs meyve oranının da fazla olduğu bu gibi bahçelerde sorun döllenme biyolojisi ile ilgilidir.

Burada en çok karşılaşılan durum çiçek açma periyotları birbirine uymayan dişi ve erkek ağaçların o bahçede bir araya gelmiş olmasıdır. *Pistacia* türleri erkekleri çiçeklenme devreleri bakımından geniş bir zaman aralığı oluşturur. İşte çiçeklenme zamanları farklı değişik erkek tipleri aynı bahçede bir araya getirilmesi döllenme bakımından çok yararlı olacaktır. Bugün için dağ köylerindeki Antepfıstığı ağaçlarının daha düzenli ve bol meyve alınmasının nedeni değişik zamanlarda çiçek tozu dağıtan bol miktarda erkek ağacın varlığıdır. Bu nedenle bahçedeki erkek ağaçlar kesilmemeli veya dişilere aşılammamalıdır, aksine bunlar iyi muhafaza edilmelidir.

2.1.2.5. Meyve Özelliği:

Meyveleri 10-20 mm uzunluk ve 6-12 mm genişlikte, uzun ovalden küreye kadar değişik şekilli ve çoğu kez yandan basıktır (Ayfer, 1959). Meyve yarı kuru ve tek çekirdekli. Meyvenin olgunluğu, yarı saydam bir halden opak bir görünüm alınca ve embriyoyu kuşatan endokarptan, mezokarp ve ekzokarp'ın

ayrılması ve yumuşamasıyla anlaşılır. Endokarp ince kırmızı-menekşe renkli ve tohum açık renklerden siyah yeşile sıralanır. Meyvelerdeki ventral açıklık (yan çizgi) ilk kez Temmuz sonlarında gözlenir. Tohum Eylül ortalarında tam fizyolojik olgunluğa ulaşır. Fizyolojik olgunluk, kabuktan epikarpın kolayca ayrılmasıyla anlaşılır (Crane, 1978). Bu ayrılma şeftalinin çekirdeğinin meyvanın etli kısmından ayrılması kadar kolaydır. Dünyada *Pistacia vera*'nın elliden fazla kültür varyetesi ve sayılamayacak sayıda yabani varyetesi bulunmaktadır (Anonim, 2002)

Kırmızı ekzokarplı meyveler üzüm gibi salkım oluştururlar (Resim 5). Fıstık çekirdeği olarak bilinirse de Antepfıstığı meyveleri yenilebilir tohum kısmı botanikte drupa tipi meyveye girer. Boyu eninden fazla olan çekirdekler yaklaşık 1-1.5 cm uzunluğunda ve 0.5-1 cm enindedir ve fildişi renkli bir kabukla kaplıdır. Meyve olgunlaşınca genellikle kabuk çatlar. Uygun olmayan yetiştirme koşullarında tohum kabuğu çatlamaz. Tohum rengi sarı ve yeşilin değişik tonlarında olabilir ve bütün tohum içinde bu renk hakimdir (Atlı, 1992).



Resim 5. Antepfıstığı meyve salkımı

Antepfıstığı yağ (yaklaşık %55) ve protein (yaklaşık %22) bakımından oldukça zengindir. Genellikle ağaçlar 5-8. yıllarında meyve vermeye başlarlar. 15 veya bazı varyetelerde 20. yılında tam verim elde edilir. Ürün verimi kuraklık, fazla yağış, sıcaklık ve fazla rüzgardan da etkilenir.

Çıtlama ve boş meyve oranı, yıllara, anaca, çiçek tozu kaynağına, çeşide, ekolojik koşullara vb. göre değişebilmektedir. Çıtlama olayı doğrudan iç gelişimine bağlıdır. Çıtlak olan meyveler her zaman çıtlamamışlara göre daha ağırdır (Nevo ve ark, 1974).

Crane (1978), endokarp sertleşmesinin, meyvenin uç tarafından ve meyve oluşumundan birkaç hafta sonra başladığını, çıtlamanın ise temmuz sonunda, meyvenin fizyolojik olarak olgunlaşmasından en az bir ay önce başladığını ve hasat süresince (Eylül ortasına kadar) devam ettiğini bildirmektedir.

Crane ve Iwakiri (1980, 1981) çıtlamanın doğrudan doğruya meyve içinin büyüme ve gelişmesiyle ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan endokarp boş meyvelerde çıtlamamaktadır.

Pontikis (1989), Yunanistan'da tozlayıcı olarak *Pistacia terebinthus* ve *Pistacia vera* erkeklerinin kullanıldığını, ancak *P. vera* çiçek tozlarının çıtlamayı arttırdığı için tercih edildiğini bildirmektedir.

2.1.2.6. Anaç Özelliği:

Ülkemizde en çok *Pistacia vera*'nın Uzun ve Kırmızı çeşitlerinin tohumlarından üretilen fideler kullanılmaktadır (Ayfer, 1990). Türkiye'de yetişen çeşitler içerisinde, Siirt çeşidinin aşı kalınlığına daha hızlı ulaştığı saptanmıştır (Tekin ve ark., 2001). Joley (1953), *Pistacia vera* tohumlarından elde edilen fidelerin toprak nematodlarına dayanıklı olduğunu belirtmektedirler. Yapılan çalışmalarda taç gelişimi ve verim yönünden *Pistacia vera*'nın, *Pistacia atlantica* ve *Pistacia khinjuk*'tan daha düşük değerler verdiği belirtilmektedir (Ulusaraç, 1992). *Pistacia vera*, *Verticillium dahliae* hastalığına hassas olması nedeniyle iyi anaç özelliğinde değildir ve son yıllarda anaç olarak önerilmemektedir.

Fideler ilk çıkışta, özellikle erken dönemlerde ısıtılan seralarda tüplü yetiştiricilikte, iri yaprakları nedeniyle kendini taşıyamadığından yatma olmaktadır. Bunu engellemek için ekimden 2 ay sonra destek dikilerek dik gelişmeleri sağlanmalıdır (Arpacı ve ark., 1999).

2.1.3. Ekolojik İstekleri

Antepfıstığı yetiştiriciliği bakımından bitkinin ekolojik isteklerini, sıcaklık, su ve toprak yönünden ele almak gerekirse; sıcaklığın yetiştiriciliği sınırlayan en önemli iklim elementlerinden biri olduğu söylenebilir. Çünkü Antepfıstığı, kış dinlenme periyodunda oldukça fazla bir soğuğa ve yaz aylarında, meyvelerini olgunlaştırabilmek için, oldukça yüksek ısı toplamına ihtiyaç gösteren bir meyve türüdür (Ayfer, 1963).

2.1.3.1. Sıcaklık İsteği

Fıstığın yayılmasında sıcaklık faktörü bakımından dört şart önemlidir (Özbek, 1978).

- Kış donları
- İlbahar geç donları
- Kış dinlenmesi
- Yaz sıcaklık toplamı

Bir yerde Antepfıstığının ekonomik olarak yetiştirilip yetiştirilemeyeceğini tetkik ederken bu dört ısı faktörünün etkilerini incelemek gerekir.

1. Kış donları: Antepfıstığının doğal yayılma alanı olan Güneydoğu Anadolu'da yazlar çok sıcak olmakla beraber, kışlar da oldukça soğuk geçer. Bölgede yazın sıcaklığı gölgede 40 °C'ye kışın da -14 ve -16 °C derecelere düşmesi doğaldır. Ocak ayı ortalama sıcaklığı 5,5-6,0°C veya kış ayları (yani Aralık, Ocak ve Şubat) ortalaması 7,0-7,5°C olan yerlerde Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılabilir. Bölgede 0°C veya bunun altındaki sıcaklıkta geçen gün sayısı yılda 49-59 dur.

Bazı ekstrem kışlarda Güney-Doğu Anadolu Bölgesinde sıcaklık -21 °C ye düşmüş ve fıstık ağaçları bundan zarar görmemiştir. Ankara şartlarında sıcaklığın -25 °C'ye düştüğü zamanlarda bile don zararından şikayet edilmediği belirtilmektedir (Özbek, 1978). Bu durum kış donları bakımından Antepfıstığı yetiştiriciliğini sınırlandıran herhangi bir faktörün söz konusu olmayacağını göstermektedir.

2. İlbahar Geç Donları: ilbaharın geç donları gerek sebzeçilikte gerekse pek çok meyve türümüzde üretimi tehdit eden en önemli etkidir. F.D. Young'ın

yaptığı araştırmalar meyve ağaçlarının düşük sıcaklığa karşı değişik fenolojik safhalarda değişik reaksiyon gösterdiklerini ve meyve ağaçlarının düşük sıcaklıktan en fazla etkilendikleri fenolojik safhanın, çiçeklerin küçük meyveye henüz dönmüş olduğu devre olduğunu ortaya koymuştur (Ayfer, 1959).

Güneydoğu Anadolu'da Antepfıstıkları genellikle Nisan ayının son iki haftası içerisinde iek açmaktadır. Bu duruma göre elverişsiz yerler ve olağan dışı yıllar söz konusu olmadıkça fıstıklarda ilkbaharın geç donlarından korkmamak gerekir. Antepfıstıklarında ieklenme, badem, kayısı ve benzeri meyvelere göre daha geç olmaktadır. Bu nedenle ilkbaharın geç donlarından zarar görme bu meyve türlerine göre daha seyrek ve daha az olmaktadır.

3. Kış Dinlenmesi: Tüm meyve ağaçlarında olduğu gibi Antepfıstıklarında da normal iek açmaları ve sürgünler verebilmeleri için belli bir süre kış dinlenmesi geçirme gereksinimi vardır. Ülkemizde bu bakımdan bir problem yoktur, zira ülkemizde, kış aylarında 7 °C'nin altında geçen sıcaklık toplamı, bu yönden en seçici olan bitki çeşitlerinin bile isteklerini karşılamaya yetecek bir ölçüdedir. Buna karşılık, Kıbrıs, Kaliforniya ve Arizona'daki fıstık yetiştiriciliği yetersiz kış soğuklamasından zarar görmektedir. Bu zarar, tomurcukların düzgün ve çok sayıda açılmaması, çiçeklerde açılmanın gecikmesi, dışı çiçeklerin reseptif (alıcı) hale gelmeden ölmeleri, yapraklanmanın gecikmesi ve salkımlarda oluşan meyvelerde olgunlaşmanın gecikmesi şeklinde olmaktadır.

4. Yaz Sıcaklık Toplamı: Antepfıstıklarında meyvenin olgunlaşması için yeterli bir yaz sıcaklığı toplamına ihtiyaç vardır. Antepfıstıkları meyvelerini olgunlaştırabilmek için, sıcak ve uzun süren kuru şartlara gereksinim duyarlar. Sıcaklık toplamının yeterli olmadığı yerlerde meyveler içlerini tamamen dolduramaz, sert kabuk çatlamaz ve dış kabuk sert kabuktan kolay ayrılmaz (Özbek, 1978). Bu durum Antepfıstığının ekonomik olarak yetişmesini engeller. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bu yönden hiçbir problem yoktur. Türkiye'nin en sıcak illerini içine alan bu bölgede fıstıklar en iyi şekilde olgunlaşmaktadır. Fıstık bölgelerimizde, yaz aylarının 21 yıllık sıcaklık ortalaması 25 °C'nin üstündedir. 30 °C'nin üstündeki günlerin sayısı ise 98-110'dur.

2.1.3.2 Su İsteği

Türkiye Antepfıstığı yetiştiriciliğinin en önemli sorunu, susuz topraklarda yetiştiricilik yapılmasından kaynaklanan verim düşüklüğüdür. Son 10 yıllık verilere göre, üretimin %85'ini, kurak ve sıcak iklimin hakim olduğu Şanlıurfa, Gaziantep ve Adıyaman illeri vermektedir. Ülkemizde bu şartlarda ortalama verim, 2.75 kg/ağaç iken sulu şartlarda fıstık tarımı yapılan Amerika'da ise bu oran ortalama 15 kg/ağaç'tır.

Antepfıstığı yurdumuzun hemen her bölgesinde sulanmadan yetiştirilir. Bu durum esas bölgede sulama imkanlarının olmayışından ve Antepfıstığının yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelere su götürülmeyişinden kaynaklanmaktadır.

Antepfıstığı kserofit (kuraklığa dayanıklı) bir bitkidir. Toprağın ve anacın çeşidine göre kökleri 5-6 metre derinliğe gidebilir. Özellikle ilk yıllarda taç sistemine göre kök sisteminin büyüme gücü çok fazladır. Bu nedenle yaz aylarında toprağın üst tabakalarında meydana gelecek kuraklıklar Antepfıstığı için önemli değildir.

Antepfıstığı topraktaki durgun sudan ve yüksek taban suyu seviyesinden hiç hoşlanmaz, bu durum uzunca bir zaman devam ederse bitkiler kurur (Ayfer, 1963).

2.1.3.3 Toprak İsteği

Antepfıstığı, başka meyvelerin yetişemeyeceği, taşlı ve kireçli topraklarda yetişebilmektedir. Bu durum bazı yanlış düşüncelere yol açmıştır. Öyle ki, Antepfıstığının başka hiçbir bitkinin yetiştirilemeyeceği sahalarda yetiştirilmesi gerekir, zannedilmiştir. Doğal olarak böyle bir görüşe katılmak mümkün değildir. Antepfıstığı zayıf topraklara ve kuraklığa karşı büyük bir direnç gösteren bir meyve türüdür. Fakat onun bu özelliğini yanlış değerlendirerek özellikle bu tür alanlara dikim yapmak, oldukça yanlış bir uygulama olacaktır. Boş bırakıp hiçbir şey almamaktansa, Antepfıstığı dikip, bir şey almak tabiki daha doğrudur. Ancak bu durumda da ondan büyük ekonomik faydalar beklemek yanlıştır. Ağacın çabuk ve kuvvetli büyümesi, bol ve düzenli bir ürün verebilmesi için hem toprak şartlarının, hem de bakım ve kültür şartlarının çok iyi olması gerekmektedir.

Pratikte, Antepfıstığının ağır killi taban topraklar hariç, her toprakta yetiştiği kabul edilir ve bu yönden incir, zeytin ve bademden daha az seçici olduğu söylenir. Bu görüş, kullanılan anaca da bağlı kalmak şartıyla, bir bakıma doğrudur. Bu nedenle toprak şartlarına göre anaç seçimine çok dikkat edilmelidir.

Anaçların değişik topraklara büyük bir adaptasyon yeteneği göstermesinden dolayı Antepfıstığının çok çeşitli topraklarda yetiştiği görülürse de, en çok nispeten derin, su tutmayan, fazla kireç içeren tınlı topraklardan hoşlanır (Kuru, 1993).

2.1.4. Dünyada ve Türkiye’de Antepfıstığı Yetiştiriciliğinin Bugünkü Durumu

Antepfıstığı Türkiye’nin 58 ilinde yetişebilmekle birlikte iklimsel istekleri optimal olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesinde karşılanabilmektedir. Bu nedenle ülkemizde Antepfıstığı üretimi Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yoğunlaşmış, son 10 yıl içerisinde özellikle Ege Bölgesinde de yaygınlaşmış ancak geniş bir üretim alanı bulamamıştır. Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki Antepfıstığı üretimi Türkiye toplam Antepfıstığı üretiminin %87.88’ini oluşturmaktadır (Polat ve ark., 2004). İller bazında Antepfıstığı üretimi karşılaştırıldığında, Şanlıurfa’nın ilk sırayı aldığı, bu ili daha sonra Gaziantep, Adıyaman, Siirt ve Batman illerinin takip ettiği görülmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Türkiye’de Antepfıstığı Ağaç Sayısı ve Üretimi (ton) ve Ürün Drumu (Ak ve ark.,1999)

Bölge	Ağaç Sayıları		Üretim		
	Toplam	Ürün Veren	Ton	%	Ürün kg/ağaç
ŞANLIURFA	14 845 660	8 125 210	21 439.8	46.11	2.64
GAZİANTEP	14 838 800	9 162 500	12 377.0	26.62	1.35
ADİYAMAN	5 490 300	3 305 000	3 817.5	8.21	1.16
K.MARAŞ	1 415 000	799 000	2 467.5	5.31	3.09
SİİRT	1 140 100	558 700	1 311.5	2.82	2.35
DİYARBAKIR	195 900	83 575	710.00	1.53	8.50
ÇANAKKALE	339 710	280 040	567.80	1.22	2.03
BATMAN	174 370	56 300	540.30	1.16	9.60
MARDİN	598 996	156 150	522.50	1.12	3.35
MANİSA	796 511	409 211	462.30	0.99	1.13
İZMİR	312 320	160 290	421.30	0.91	2.63
AYDIN	363 780	144 180	381.50	0.82	2.65
TOPLAM	40 511 447	23 240 156	45 019	96.82	1.94
Diğerleri	3 568 553	1 239 844	1 481	3.18	1.19
TÜRKİYE	44 080 000	24 480 000	46 500	100.00	1.90

Ülkemizde çok eski zamanlardan beri Antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapılmasına karşın, üretim istenilen seviyede artmamış ve entansif üretime geçilememiştir. Bunun nedenleri; Antepfıstığının öteki meyve türlerinin ve sebzelerinin yetişemeyeceği kötü toprak koşullarında yetiştirileceği kanısının yaygın olması nedeni ile yetiştiriciliğin tamamen kuru koşullarda ve çoğunlukla kıraç, taşlık ve meyilli arazilerde yapılması, kötü koşullarda yetiştirilen Antepfıstıklarının gençlik kısırlıklarının fazla olması, yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerimizin mutlak periyodisiteye daha yatkın olması ve özellikle üstün nitelikli erkeklerin bulunmayışıdır. Bu sorunlar yüzünden üreticiler birinci sınıf arazilerde Antepfıstığı yetiştirmeye yanaşmamaktadır. İran ve ABD dışındaki üretici ülkelerde de yetiştirme koşulları Türkiye'dekine benzemektedir. İran ve A.B.D.'deki yetiştiriciliğin tamamı sulu koşullarda ve verimli taban arazilerde yapılmaktadır (Tablo 2). Buna karşın ülkemizde Antepfıstığı yetiştiriciliğinin sadece % 37.5'u sulu koşullarda, geri kalan % 62.5'u ise tamamen kuru şartlar altında yapılmaktadır (Polat ve ark, 2004).

Tablo 2 : Dünya fıstık üretiminin yıllara ve ülkelere göre dağılımı

Yıl	*İran	**İran (RPPC)	U.S.A.	Türkiye	Suriye	Yunanistan	İtalya	Toplam (Lbs) (w/oRPP Tah.)
1977	44.0	v/y	4.5	39.6	11.8	3.6	4.4	107.9
1978	132.0	v/y	2.5	4.0	15.2	3.2	0.4	157.3
1979	22.0	v/y	17.2	35.2	17.0	4.8	10.0	106.2
1980	55.0	v/y	27.2	15.4	11.0	5.6	0.4	114.6
1981	92.4	v/y	14.4	46.2	20.2	5.0	9.8	188.0
1982	50.6	v/y	43.9	24.2	17.6	3.6	0.4	140.3
1983	132.0	v/y	26.3	39.6	20.2	5.6	8.8	232.5
1984	154.0	v/y	63.0	33.0	23.8	4.4	0.4	278.6
1985	140.0	v/y	27.1	72.6	22.0	5.0	4.4	271.1
1986	130.0	v/y	76.7	44.0	31.4	5.0	0.6	287.7
1987	70.0	v/y	33.0	55.0	27.6	8.8	8.8	203.2
1988	180.0	187.4	93.4	33.0	39.4	6.6	0.6	353.0
1989	70.0	88.2	38.8	77.2	34.8	10.8	7.2	238.8
1990	200.0	209.4	119.8	30.8	44.0	5.8	0.6	401.0
1991	401.2	99.2	76.3	99.2	24.0	5.0	6.6	612.3
1992	445.3	242.5	146.5	44.0	44.0	10.0	0.6	690.4
1993	504.9	220.5	150.9	110.0	48.4	9.0	8.8	832.0
1994	429.9	143.3	128.3	55.1	52.9	9.3	0.7	676.2
1995	518.1	264.6	147.7	66.1	35.3	8.8	4.9	780.9
1996	175.0	v/y	104.3	88.2	39.7	9.6	0.7	417.5
1997	150.0	100.0	179.5	88.1	33.1	11.0	8.8	470.5
1998	375.0	v/y	187.5	55.1	79.4	11.0	1,1	709,1
1999	289,2	289,2	122.4	88.0	66.3	11.0	5,8	582,7
2000	264,6	264,6	241.6	132.3	68.3	14.3	0.2	721,3
2001	253,5	154,3	160,3	77,2	88,0	14,3	0,2	593,5
2002	485,0	396,8	302,4	77,2	116,5	18,7	4,1	1003,9
2003	407.6	364.0	118.0	198.4	110.2	19.8	4.4	858.4
2004	418.9	286.6	346.8	66.1	88.2	20.9	5.3	946.2
2005	418.9	396.8	282.4	132.3	132.3	20.9	5.3	992.1

Kaynak :Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı

v/y : Veri Yok

Kaliforniya Fıstık Komisyonu.

Değerler(Lbs): Million Libres

Kaynak(*) :İran Tarım Bakanlığı

(1 Lbs: 0.4 kg)

Kaynak(**) :Rafsancan Fıstık Üreticileri Kooperatifi (RPPC)

Dünyada Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılan alan toplamı 434.072 ha'dır. Bu toplam alanın yaklaşık % 65'i yani 280.000 ha'lık alan İran'dadır. A.B.D. 44.000 ha ile bu bakımdan ikinci, Türkiye ise 40.000 ha ile dünyada üçüncü durumdadır (Karim Koshteh M.H. ve Vardan E. Urutyanyan, 2003). Bu ülkeleri 23.000 ha ile Tunus, 18.500 ha ile Suriye ve 15.000 ha ile Çin izlemektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılan alan miktarları

Yıllar	Türkiye (ha)	İran (ha)	A.B.D. (ha)	Dünya (ha)
1991	30114	161461	22540	291602
1992	31429	171630	22860	311561
1993	32783	201893	23070	337890
1994	33343	206000	23270	343873
1995	34071	218000	24400	355046
1996	34981	231945	26000	372171
1997	36200	247130	26814	385819
1998	37214	259431	27880	401726
1999	37685	256444	29110	393860
2000	36349	274728	30200	407029
2001	36999	280510	31565	417746
2002	40000	280000	44000	434072

Kaynak: FAOSTAT, FAO, UNO (Anonim, 2003a,b)

İran ve A.B.D. yoğun koşullarda yetiştirme yapmakta, yani sık dikilen bahçelerde sulama ve gübrelemenin olduğu görülmektedir. Bunun yanında söz konusu ülkelerde çeşit standardı sağlanmış, bahçeler oransal periyodisitesi olan kaliteli, verimli tek bir çeşit ve bu çeşide uygun üstün nitelikli bir erkekle kurulmuştur.

A.B.D.'de Antepfıstığı yetiştiriciliği, düzenli ve geniş bir araştırma neticesinde başlamıştır. 1930'lu yıllarda İran ve Orta Doğuda seleksiyon yapılarak yeni çeşit ıslahına başlanmış, 1960'lı yıllarda elde edilen çeşit ve anaçlarla 1970'li yıllarda devletin de desteklemesi sonucu sulu koşullarda çok büyük (5-10 bin dekar) Antepfıstığı bahçeleri tesis edilmiştir. A.B.D. günümüzdeki üretimiyle ülkemizi de geçmiş dünyada ikinci büyük üretici ülke konumuna gelmiştir. A.B.D. bu hızlı gelişmeyi; yetiştiriciliğin sulu koşullarda, nematodlara ve hastalıklara dayanıklı anaçla, verimli ve kaliteli tek seçkin çeşitle yapılmasına,

standardizasyon, pazarlama ve tanıtım organizasyonun iyi yapılmasına, güçlü üretici birliklerinin oluşturulması gibi nedenlere borçludur.

A.B.D.'de çoğunlukla damlama sulama sistemi kullanılmaktadır. Uygun ve yeterli gübreleme yapılmakta, mekanik budama sistemi uygulanmakta ve diğer bakım tedbirlerinin de tamamlanmasıyla 25-30 yaşlarındaki bir ağaçtan ortalama 16-18 kg ürün alınabilmektedir.

A.B.D. ve İran'daki yetiştiricilikteki bu uygulamalara karşılık, ülkemizde Antepfıstığı genellikle kıraç, meyilli, toprakları kireçli, taşlık ve kayalık arazilerde yetiştirilmektedir ve kuru koşullarda ağaç başına ortalama verim ortalama 3-4 kg civarındadır. Ülkemizde Antepfıstığı kültürününün % 72.5'u kıraç topraklarda, geriye kalan % 27.5'i ise verimli (fertil) topraklarda yapılmaktadır (Polat ve ark, 2004). Bu yetiştirme bölgelerinde yıllık yağış ortalaması genellikle 600 mm.'nin altındadır. Bu bahçelere sulama yapılmamakta, yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerde mutlak periyodisite görülmektedir. Bahçelerde ağaçların seyrek olduğu ve erkek ağaçlara önem verilmediği için bahçelerde dişi ağaçlara yeterli ve çiçeklenme dönemi uygun erkek bulundurulmamaktadır. Bu yüzden boş (partenokarp) meyve oranı yüksek olmaktadır. Ülkemizdeki bu geleneksel yetiştiriciliğin yanında, uygun ekolojide, iyi çeşitler ve uygun tozlayıcılar kullanılarak ve yoğun koşullarda yetiştiricilik yapılan bahçelerden 764 kg/da ürün alınabileceği saptanmıştır (Akkök ve Karaca, 1993).

Üreticilerimiz uzun yıllardır erkek ağaçların işlevini ve önemini anlayamadığından bahçelerindeki erkekleri aşlamak suretiyle dişiye çevirmişlerdir. Bu üreticilerimizin bahçelerinin yakınlarında yabancı *Pistacia* türleri bulunduğundan ilk zamanlarda bahçelerinde dölleme ile ilgili bir sorun oluşmamıştır. Dölleme sorunları ancak çevredeki yabancılıkların kültür çeşitlerine dönüştürülmesiyle ortaya çıkmaya başlamış, salkım silmesi, salkım seyrelmesi ve boş meyve oranında yükselme gibi sorunlar çoğalmıştır. Antepfıstığı yetiştiriciliğinde mevcut olan ve son yıllarda da yaygın olarak şikayetlere neden olan tozlaşma ve dölleme sorunlarına en kısa zamanda çözüm bulunması gerekmektedir.

Ancak tüm bu olumsuzluklara karşın, önemli Antepfıstığı çeşitlerimize uygun üstün nitelikli tozlayıcılar selekte edilerek, tozlaşma ve dölllenme yetersizliğinden meydana gelen salkım silkmesi, salkım seyrelmesi ve boş meyve oluşumu gibi sorunlara çözüm bulmak amacıyla Gaziantep’te Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü bünyesinde “Önemli Bazı Antepfıstığı Çeşitleri İçin Gaziantep ve Çevresindeki Erkek Tiplerin Seçilmesi” adlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Atlı ve Kaşka, 2003)

Bununla birlikte, İran’ın sulama potansiyelinin sonuna gelmesine karşılık, Türkiye’nin henüz kullanmadığı büyük bir sulu Antepfıstığı yetiştirme potansiyeli vardır. Ayrıca, yeni kurulacak bu bahçelerde, İran orijinli fıstıkların doğrudan kullanılması ile verim, irilik ve çıtlama konusundaki acil sorun çözülürken, orta vadede, yerli fıstıkların üstün kalite özellikleri, erken meyveye başlama, irilik ve yüksek çıtlama gibi mutlak gerekli ticari özelliklerle birleştirilebilir ve böylece İran ve ABD’ye karşı mukayeseli bir avantaj elde edilebilir.

Tüketicilerdeki bilinçlenme düzeyi yükseldikçe, İran fıstığının üretim ve işlenmesi sırasındaki bazı hijyenik yetersizlikler daha çok sorgulanacağından, yalnızca ucuz olma, pazar payının muhafazasına yetmeyecektir. Türkiye’nin de kendi teknolojilerini hızla modernize etmesi koşuluyla, bu bir fırsata dönüştürülebilecektir.

2.1.5. Antepfıstığının İnsan Beslenmesindeki Önemi

Protein insan beslenmesinde önemli bir yer tutar. Protein noksanlığının bitkisel üretimle karşılanması, son yıllarda ve özellikle gelişmiş ülkelerde artan bir eğilimdir. Antepfıstığının protein ve diğer elementlerce zengin oluşu, onu daha da cazip duruma getirmektedir. Antepfıstığının 100 gramının bileşimi diğer önemli ürünlerle birlikte aşağıdaki gibi rapor edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Antepfıstığı, Fındık, Ceviz ve Sığır Eti Besin Değerleri

Yenilen 100 g'da	Antepfıstığı	Fındık	Ceviz	Sığır Eti
Protein (%)	19.3	12.6	14.8	13.6
Yağ (%)	53.7	62.4	64.0	41.0
Karbohidrat (%)	19.0	16.7	15.8	-
Ca (mg)	131.0	209.0	99.0	8.0
P (mg)	500.0	337.0	380.0	124.0
Fe (mg)	7.3	3.4	3.1	2.0
K (mg)	972.0	704.0	450.0	355.0
Mg (mg)	120.0	-	158.0	-
Vitamin A (iu)	230.0	-	30.0	80.0
Vitamin B1 (mg)	0.67	0.46	0.23	0.06
Vitamin B6 (mg)	1.4	0.90	0.90	3.3
Vitamin E (mg)	5.2	-	0.70	-
Vitamin C (mg)	7.0	-	-	-
Kalori	597.0	634.0	651.0	428.0

Kaynak: Tekin ve ark., 2001, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Antep fıstığı yetiştiriciliği kitabı)

Tablo 4'te de görüldüğü gibi Antepfıstığı meyvesinin protein karbohidrat, potasyum, fosfor, demir, Vitamin A ve B1 yönünden fındık, ceviz ve sığır etinden daha zengin olduğu anlaşılmaktadır (Tekin H. ve ark, 2001)

Yine başka kaynaklardan alınan, Antepfıstığı'nın 100 gramında bulunan bileşenlerin gram, kj, kcal bakımından içerdiği besin değerleri, vitamin, mineral ve yağ asidi miktarları aşağıda verilmektedir (Tablo 5, 6).

Tablo 5. Antepfıstığı'nın 100 gr'nın içerdiği besin değerleri

Yenilen miktar			
(Her 100g)			
	<i>Gram</i>	<i>(KJ)</i>	<i>(kcal)</i>
<i>Protein</i>	20.8g	387.27	92.56
<i>Yağ</i>	51.6g	2007.82	479.88
<i>Karbohidrat</i>	16.4g	231.99	50.28
<i>Diğer</i>	11.2g	56.2	18.6
Toplam	100g	2683.28	641.32

Kaynak: USDA Nutrient Database for Standard Reference
(Karim Koshteh M.H. ve Vardan E. Urutyan, 2003)

Tablo 6. Antepfıstığı'nın 100 gr'nın içerdiği mineral madde, vitamin ve yağ asidi değerleri

Besin İçeriği	Birim	100 g. daki miktarı
Mineraller		
Kalsiyum, Ca	mg	107
Demir, Fe	mg	4.15
Magnezyum, Mg	mg	121
Fosfor, P	mg	490
Potasyum, K	mg	1.025
Sodyum, Na	mg	1
Çinko, Zn	mg	2.20
Bakır, Cu	mg	1.300
Mangan, Mn	mg	1.200
Selenyum, Se	µg	7.0
Vitaminler		
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	5.0
Tiamin	mg	0.870
Riboflavin	mg	0.160
Niacin	mg	1.300
Pantothenic acid	mg	0.520
Vitamin B-6	mg	1.700
Folate, total	µg	51
Vitamin A, IU	Iu	553
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	2.30
Tocopherol, gamma	mg	22.60
Yağlar		
Toplam Yağ Asitleri	g	42.214
Fitosteroller	mg	214
Stigmasterol	mg	5
Campesterol	mg	10
Beta-sitosterol	mg	198
Amino asitler		
Tryptophan	g	0.273
Isoleucine	g	0.900
Methionine	g	0.338
Cystine	g	0.357
Phenylalanine	g	1.062
Valine	g	1.239
Arginine	g	2.028
Alanine	g	0.921
Aspartic acid	g	1.817
Glutamic acid	g	3.819
Serine	g	1.225
Diğer		
Karoten, beta	µg	332

Kaynak: Anonim, 2004, USDA Nutrient Database For Standard Reference
(International Nut and Dried Fruit Council)

Diğer kuruyemişlerle karşılaştırıldığında Antepfıstığının protein, A, B6, E ve tiamin gibi uzun bir vitamin listesine sahip olduğu ve potasyum, kalsiyum, demir, fosfor ve magnezyum gibi gerekli mineral elementleri de içerdiği görülür.

Yukarıda sayılan çok önemli besin değerlerinin yanı sıra; Antepfıstığının insan sağlığına ve beslenmesine önemli katkıları da vardır;

Antepfıstığından yapılan şurup, balgam söktürücüdür, bronşite de iyi gelir: Bunun için fıstık içi bir havanda içine biraz su konularak ezilir. Sonra içine bir miktar daha su ile şeker katılarak kaynatılır. Böylece hazırlanan şuruptan içilir.

Antepfıstığı, ince bağırsakta glikoz emilimini azaltır ve kan sekerinin yükselmesini önler: Bu bakımdan şeker hastalarına fıstık yemeleri öğütlenir.

Ayrıca Antepfıstığı, yapısındaki doymamış yağ oranının yüksekliğiyle kan şekerinin yükselme riskini azaltır. Kolesterol içermediği gibi, kandaki kolesterol düzeyini düşürücü etkisi de vardır: böylece koroner kalp yetmezliği riskini de azaltır (Anonim, 2006c).

Antepfıstığının afrodizyak etkisi de vardır: Bunun için fıstık içi bolca yenilir ya da içine fıstık içi katılmış besinler tüketilir.

Günde 10-12 adet yenilen iç Antepfıstığı, vücudun günlük yağ ihtiyacını karşılayabilmektedir.

100 gr Antepfıstığı vücudun günlük protein, Vitamin B1 ve fosfor ihtiyacının % 35'ni karşılamaktadır. Antepfıstığı sığır etinden protein yönünden 2 kat, fosfor yönünden ise 4 kat daha üstündür. Vitamin E, B ve C kompleksince zengindir.

2.1.6. Geleneksel Çoğaltma Metotları

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

Kuru ve ark. (1986) da ekimden önce 13-14°C'de 15 gün kadar tohumların suda bekletilmesinin çimlenme oranını arttırdığını ileri sürmektedirler. Bunun

yanı sıra, ekimden önce tohum kabuğunun çatlatılmasının da, çimlenme oranını arttırdığı gözlenmiştir.

Çapraz tozlaşma nedeniyle ticari fıstık ağaçları aslında yabani popülasyonlar kadar değişkendir. Günümüzde fıstık ağaçları çelikle üretimin zorlukları nedeniyle ya tohumlardan üretilen fidelerden ya da budanmış olgun çeliklerin, genç anaçlar üzerine aşılması yoluyla çoğaltılmaktadır.

Fıstık tohumlarındaki genetik varyasyon kontrollü tozlaşma ile sağlanabilir. Kontrollü hibridizasyon ile Antep fıstığının fidelerinin üretimi henüz yapılmamıştır. Antep fıstığı dioik bir bitkidir. Bu nedenle de hibridizasyonla istenilen ürün niteliklerine sahip erkek ve dişi bitkilerin birleştirilmesi mümkün değildir (Barghchi ve Alderson, 1989). Herhangi bir fıstık üretim bölgesinde az sayıda varyete adapte olabilir.

Bazı fıstık türleri anaç olarak kullanılabilir. Anaç çapı, diğer meyve ağaçlarının tomurcukları ile karşılaştırıldığında daha büyük olan Antepfıstığı tomurcuklarının, yerleştirilebileceği kadar büyük olmalıdır (Joley, 1979, Woodroof, 1979).

Amerika Birleşik devletlerinde dişi “Kerman” ve erkek “Peters” varyeteleri, nematodlara ve *Verticillium*'a *P. vera*'dan daha dayanıklı olan *P. atlantica* ve *P. integerrima* anaçları üzerine aşılmaktadır. Kaliforniya fıstık endüstrisi model olarak seçilen iki fidan üzerinde çalışmalar yapmıştır. Fıstık üretiminde “kerman” dişi varyete ve “Peters” dölleyici (pollinizer) tozlaştırıcı erkek varyete olarak kullanılmıştır (Dollo ve ark., 1995). Antep fıstığı ıslah programı ilk olarak Kaliforniya’da 1970’li yıllarda başlamıştır. Amerika’yı takiben bazı ülkelerde de ıslah programları başlatılmıştır

Bununla birlikte genellikle Türkiye, İran ve diğer Ortadoğu ülkelerinde, yeni bahçelerin kurulmasında *Pistacia vera* anaç olarak kullanılır.

Türkiye’de fıstık yetiştiriciliği yapılan bölgelerde aşılama en yaygın çoğaltma tekniğidir. Bu teknikte sadece yılın belli bir döneminde ve çok kısa bir süre için uygulanabilir (Kaşka ve ark., 1990). Fıstıkta genel olarak geleneksel vejetatif çoğaltma metotları halen birçok probleme sahiptir.

Pistacia vera, *Pistacia* türleri arasında ticari değeri olan yenilebilen ürün veren tek türdür. Aşılı Antepfıstığı ağaçlarının üretiminde kullanılan 9 anaç türü

vardır. Bunlar; *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. mutica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* ve *P. vera* (Barghchi ve Alderson, 1989). *P. atlantica*, *P. integerrima* ve *P. terebinthus* Kaliforniya’da kullanılan başlıca anaçlardır. Bu anaçlar fungus ve nematodlara karşı daha dirençlidirler. (Michailides et al., 1988). *P. mutica* ve *P. khinjuk* İran’da çok yaygın olarak kullanılan anaçlardır. Türkiye’de ise ya doğal olarak yetişen yabancı fıstık ağaçları ya da *P. vera* fideleri anaç olarak kullanılır.

Fıstığa bir çok fungi (mantar) saldırır. En zararlı fungus değişik yaşlardaki ağaçları kolayca öldüren *Verticillium wilt*’tir (Duke, 1989). Pekçok fıstık türü aşılansak *Verticillium*’a direnç kazanmıştır (*P. integerrima*, *P. atlantica*, *P. terebinthus* ve hibritleştirilmiş *P. atlantica* – *P. integerrima* anaçları) (Ferguson ve Arpaia, 1990).

Anaçlarda aranılan özellikler; nematodlara, toprakta bulunan mantarlara ve tuzlu toprağa karşı dirençlilik ve iyi büyüme ve gelişme gösterebilmeleridir.

Çeşitli *Pistacia* varyeteleri anaç olarak kullanılabilir. Amerikada Kerman (Dişil) ve Peters (eril) normal olarak *P. atlantica* yada *P. integerrima* anaçları üzerine aşılır (Hall, 1975, Joley, 1979; Crane ve Iwakiri, 1981).

Bu aşılama *P. atlantica* ve *P. integerrima*’yı nematodlara ve *Verticillium*’a, *Pistacia vera*’dan daha dirençli hale getirmiştir. Bununla beraber Türkiye, İran ve diğer ortadoğu ülkelerinde genellikle meyve bahçeleri için anaç olarak *P. vera* kullanılır. *P. vera*’nın tercih nedeni *P. vera* fidelerinin diğer türlerden daha fazla yan kök ve kalın gövdeye sahip olması ve kısa dönemde tomurcuklanmaya gidebilmesidir (Ayfer ve ark., 1990). Bununla beraber, fidanlar arasındaki büyüme farklılıkları ara aşılama gerektiren fide stoklarında tutarsız sonuçlar oluşturmuştur. *P. atlantica* ve *P. khinjuk* fideleri boyuna hızlı gelişme göstermekte ancak diğer türlerden daha cılız fideler oluşmakta ve tomurcuklanma büyüklüğüne daha geç ulaşmaktadır. Bununla birlikte varyeteler ve anaçlar arasında stok fide uyumsuzluğu olmamaktadır. *P. atlantica* ve *P. terrebinthus* fideleri ticari üretimde geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Joley ve Opitz, 1971; Woodroof, 1979; Hartman ve Kester, 1983). Fidanlıklarda karakteristik olarak yavaş büyümelerine rağmen *P. vera* üzerine iki anaç üzerinde en çok çalışılan varyetelerin aşılması daha hızlı büyümeyi ve daha fazla mahsul elde etmeyi

sağlamıştır (Joley, 1979). *P. atlantica* ve *P. terrebinthus*'un, *Verticillium*'a son derece hassas olduğu bildirilmiştir (Hartman ve Kester, 1983). Çok yavaş büyüme alışkanlığından dolayı *P. terrebinthus* cüce ağaçları erken ürün vererek büyük miktarda ve yüksek kalitede meyva üretir. Genellikle *P. terrebinthus*'un *P. vera* ile birlikte sulu tarım için uygun anaç oldukları kabul edilir (Ayfer ve ark., 1990).

Fıstık genellikle *Pistacia* türlerinin, heterozigot anaç fideleri üzerine seçilmiş döllerin tomurcuklanması ya da aşılmasıyla üretilir. Çelik ve köklendirmede bazı başarılı sonuçlar bildirilmesine rağmen Antepfıstığı kolayca olgun ağaçlardan kesilerek çoğaltılamaz (Al Barazi ve Schwaba, 1982).

Ticarette, fıstık ağaç karakteristiklerine göre sınıflandırılır (büyüklük, perikarp yarığı (dehiscence) sınıfı, kernel rengi) (Ayfer, 1990). Fıstığın bu özelliklerinden başka polen üretimi, çiçeklenme zamanı, ürün kalitesi ve potansiyeli, rekolte (ürün) miktarı sabitliği (boş tohum ve nadastan sakınarak) erken ürün veren varyeteler ve ağaç formları için fideler seçilebilir. Temel yetiştirme amaçları; kuvvetli güçlü ağaçlar, yaşı, büyüme alışkanlığı, olgunluk yüksekliği; bununla birlikte kendine özgü çiçeklenme zamanı, erken ürün, hastalıklara karşı dirençlilik, tuz dayanıklılığı, mekanik hasat için ağaç yapısı ile üstün fıstık kalitesi ve mahsulüdür.

İran'da fıstık ihracatçıları fıstığı çoğunlukla 30 farklı kayıtlı varyeteden sağlamaktadır (Barghchi ve Anderson, 1989). "Ohadi" İran'da tüm fıstık üretiminin % 80'inde ana fidan varyetesi olarak kullanılmaktadır (Barghchi, 1982). "Kellegouchi", "Sedifi", "Vahidi", "Mümtaz" ve "Kerman" İran fidan varyeteleri, Türkiye'nin güneydoğusunda deneme sahalarında test edilmektedir (Kuru ve ark., 1990). Amerika'da California'da temel üretimin tamamına yakını dişi varyete (Kerman) ve erkek varyete (Peters)'in sulama şartlarında yapılmaktadır (Ferguson ve Arpaia, 1990). "Kerman" gibi "Lassen"de büyük miktarlarda ve kalitede California'da üretilmektedir.

Ancak bilindiği ve daha önce de belirtildiği gibi, günümüzde fıstık ağaçlarının çoğaltımında kullanılan tüm bu geleneksel metotlar talepleri karşılamada belirgin bir şekilde yetersiz kalmaktadır ve bu nedenle mevcut çoğaltım teknikleri bitki hücre, doku ve organ kültür teknikleri gibi geleneksel metotlara alternatif yeni metotlarla desteklenmelidir.

2.2. Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Teknikleri

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

Bitki hücre ve doku kültürleri aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar;

1- Organ Kültürleri

- Kök kültürleri
- Sürgün (apikal) kültürleri
- Anter ve polen kültürleri

2- Doku Kültürleri (Kallus)

3- Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları)

4- Somatik Embriyogenezis

5- Mikroaşılama

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

Genel anlamda mikroçoğaltma; sürgün ucu ve bunlara ait eksplantlardan bitkilerin *in vitro* klonal çoğaltılması veya genellikle tomurcuklardan gelişen sürgünlerin alt kültürler boyunca çoğaltılması şeklinde tanımlanabilir. Ayrıca meristem dokulardan meydana gelen doğrudan somatik embriyo oluşumuna da mikroçoğaltım denilebilir.

Ancak mikroçoğaltımı, sentetik besi ortamlarında, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturma potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre yada polen tanesi vb.) aseptik şartlar altında

yeni bitkilerin elde edilmesi şeklinde tanımlayabiliriz (Mansuroğlu S., Gürel E., 2002).

Bu şartlarda kültür, 4-8 hafta sonra da alt kültür yapılabilir. İlk kez Morel (1960) tarafından çalışılan bitki materyallerinin hızlı klonal çoğaltımı için apeks meristem kültürleri kullanılır. Başka bir şekilde bir kallus ya da süspansiyon kültürü yapılabilir ve alt kültürler sonucunda da bitki formuna yükseltilebilir. Bu metot özellikle serbest patojenlerin hızlı artışının olduğu heterozigot ve süs bitkileri üretimi için kullanışlıdır.

Mikroçoğaltımın genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemi ve avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- a. Her türlü hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal ve stokların elde edilmesi
- b. Elde edilen bitkilerde fenotipik ve genotipik homojenitenin sağlanması
- c. Geleneksel yöntemlerden daha kısa kültür süresine sahip olması
- d. Üretilmesi güç olan bitki türlerinin daha kolay üretimine imkan vermesi
- e. Seçkin veya üstün genotiplerin hızlı çoğaltımına olanak sağlanması
- f. Klasik yöntemlere göre üretimde daha az anaç kullanılması
- g. Somaklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin veya genotiplerin elde edilebilmesi
- h. Bazı bitki materyallerinin hızlı bir şekilde elde edilmesini, klonlamada kullanılacak materyalin erken elde edilmesini sonuçlandırması
- i. Verimsiz hibritlerin çoğaltımı için önemlidir. Örneğin meyve bahçelerindeki türlerin yada fıstık gibi son derece değişken heterozigot türlerin klonal çoğaltımı yoluyla tek tip bitki topluluğu elde edilmesi
- j. Yıl boyunca ortaya çıkabilecek mevsimsel zorlukları ortadan kaldırması
- k. İstenilen genotipe bitkilerin çoğaltılmasını mümkün kılması
- l. Tohumdan yetiştirme metotlarından daha hızlı bir şekilde çoğaltım sağlanması
- m. Küçük bir yerde çok miktarda fide/fidan üretimine olanak sağlanması

- n. Alt kültürler arasında özel bir dikkat gerektirmemesi (örn. sulama, zararlı ot mücadelesi vb.)
- o. İhtiyaca göre bazı türler için otomatik çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesini mümkün kılması
- p. Rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları için ara devre oluşturması
- q. Transgenik bitkilerin klonlanması için bir araç olması
- r. Sentetik tohum üretimine olanak sağlamasıdır.

2.3.1. Erkek Antepfıstığı Ağaçlarının Mikroçoğaltılması

Erkek Antepfıstığı ağaçlarının *in vitro* mikroçoğaltımıyla ilgili literatürde rapor edilmiş bir çalışma yoktur. Bundan dolayı aşağıda maternal Antepfıstığı ile yapılan *in vitro* çalışmalar derlenmiştir.

Günümüzde Antepfıstığı ağaçlarının geleneksel yöntemlerle çoğaltılması ya da propagasyonu, bir anaç fide üzerine ürün veren ağaçlardan alınan çeliklerin aşılması yoluyla yapılmaktadır. Yaşlı ağaçlardan alınan çeliklerin köklenmesi hemen hemen imkansızdır. Fıstık türleri dioiktir ve fıstık üretilen bazı bölgelerde yerel üretim için yalnız bir dişi varyete egemendir. Türler dioik olduklarından dolayı dişi ve erkek sürgünlerin aynı anaç üzerine aşılması yaygın olarak uygulanmaktadır. Anaç ve çelik arasındaki uyumsuzluk sık sık ara-aşılamaı gerektirir. Fıstık bahçelerinin genişletilmesi verimsiz vejetatif propagasyon metotlarıyla kısıtlı kalmıştır. Yeni ticari varyetelerin yetiştirilmesi ve klonal anaç yetiştirilmesi için, bitki hücre, doku ve organ kültürü tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

İstenilen nitelikte ürün veren Antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantlardan klonlanarak yeni Antepfıstığı bahçelerinin kurulması için araştırmalar yaklaşık 25 yıl önce başlamıştır (Barghchi 1982). Yüzyıllarca fıstık ağaçları yetiştirilmiş olmasına rağmen; bu türlerin çoğaltımına maalesef 1982'den beri özel bir önem verilmiştir.

Fıstık türlerinin mikro çoğaltılması üzerine yayınlanmış araştırmaların çoğunda genç bitkiler ve daha az miktarda yaşlı bitkisel materyal kullanılmış ve Antepfıstığının biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltılmasında kullanılabilecek *in vitro* kültür koşullarının ayrıntıları ile bu konuda yapılan yayınlar altı ayrı

derlemede toplanmıştır (Hansman ve Owens, 1986; Barghchi ve Alderson, 1989; Onay ve Jefree (2000), Onay 2003; Onay ve ark. 2003, Onay ve ark, 2005).

Fıstık türlerinin mikroçoğaltımı üzerine yapılan çalışmalarda daha çok doğal ortamdan ayrılan eksplantların yüzey sterilizasyonu, kültür koşullarının fiziksel kontrolü, uygun eksplantların seçimi yoluyla fıstık ağaçlarının doku kültürü yöntemleriyle çoğaltılmasına çalışılmıştır. Antepfıstığı ve anaçlarının üzerinde bugüne kadar yapılan bütün *in vitro* çalışmalar Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. Fıstık türlerinin ve anaçlarının in vitro çoğaltılması

Türler/Anaçlar	Eksplant Kaynağı	Ortam (mg ^l)	Morfolojik cevap	Referans
<i>P. vera</i> L. RootStocks	yt/at	MS + BA (4)	Sürgün çoğaltımı, Sürgün rejenerasyonu	Barghchi, 1982
<i>P. vera</i> L. RootStocks	yt/at	MS + BA + NAA 1/2MS	Bitki rejenerasyonu, Kallus oluşumu	Alderson ve Barghchi, 1982
<i>P. vera</i> L. RootStocks	su/at	MS + kin (2-4) MS + kin (2-4) + NAA (0.25-1) + PhG Mod MS + IBA (2.5)	Tek sürgün gelişme İndirgenmiş çoklu sürgün, Köklü bitkicik	Barghchi ve Alderson, 1983a,b
<i>P. vera</i> L.	at	EM + BA (3) + GA3 (0.5) + IAA (0.001)	Sürgün çoğaltımı, Bitki rejenerasyonu	Bustamante- Garcia MA, 1984
<i>P. vera</i> L.	su		Sürgün büyümesi	Al-Ramadhani, 1985
<i>P. vera</i> L. RootStocks	su/lt	MS + BA (4) Mod MS + IBA (2.5)	Sürgün proliferasyonu Bitkicik rejenerasyonu	Barghchi ve Alderson, 1985
<i>P. vera</i> L. RootStocks	at/lt	MS + kin (2-4) MS + BA (4) Mod MS + IBA (2.5)	Tek sürgün büyümesi, Çoklu sürgün oluşumu, Köklü bitkicik.	Barghchi, 1986a
<i>P. vera</i> L. Kerman ve Peter's	at/lt	MS + BA (0.3) + IBA (0.05) MS + 2,4-D + BA	Sürgün büyümesi, Kallus oluşumu.	Barghchi, 1985
<i>P. vera</i> L.	su	MS + BA	Sürgün büyümesi ve nekrozis	Barghchi, 1986b
<i>P. vera</i>	su/at	MS + BA	Sürgün büyümesi	Martinelli, 1988
<i>P. vera</i> L.	su		Bitki rejenerasyonu, Sürgün büyümesi	Gonzales ve Frutos, 1990
<i>P. vera</i> L. Mateur	su	MS + BA (4) MS + IBA (1-2))	Çoklu sürgün oluşumu, Köklenme	Abousalim 1990
<i>P. vera</i> L. Antep	lt	MS + kin (4) + NAA (1)	Bitkicik rejenerasyonu	Yücel et al., 1991
<i>P. vera</i> L.	su/lt	MS + BA (0.1) ve IBA (0.1) 1/2 MS + IBA (1.5-2.5)	Çoklu sürgün oluşumu, Fidelerin köklenmesi	Yang ve Lüdders, 1993
<i>P. vera</i> L. Mateur	su	MS + BA (3)	Nekrotik sürgünler	Abousalim ve Mantell, 1994

Tablo 7. nin devamı

Türler/Anaçlar	Eksplant Kaynağı	Ortam (mg^l)	Morfolojik cevap	Referans
P. vera L. Kerman ve Stewart	su	MS + BA (1) + IBA (0.2) + MeJa (0.3-3.2µM) NAA (5.9) + MeJa (1 µM)	Sürgün çoğaltımı Bitkiciklerin köklenmesi	Dolcet Sanjuan ve Claveria, 1995
P. vera L.	su	DKW +BA + IBA DKW + IBA	Çoklu sürgün oluşumu, Köklü bitkicik	Parfitt ve Almehdi, 1994
P. vera L.	su	MS basal	Sürgün oluşumu	Ghorbel et al., 1997
P. vera L. Antep	lt	MS + BA (0.5-8)	Çoklu sürgün oluşumu, Bitki rejenerasyonu	Onay, 2000a
P. vera L. RootStocks	at/lt/ypr	Mod MS + Cyt + Aux	Kallus oluşumu Organojenez	Barghchi 1982; Barghchi ve Alderson, 1983b
P. vera Lambertin	at/lt/inf	MS + BA (0.3) + IBA (0.05) MS + 2,4-D + BA	Sürgün büyümesi, Kallus oluşumu	Barghchi ve Martinelli, 1984
P. vera L.	om	MS + 2,4-D (4) + NAA (2) + kin (2)	Kallus oluşumu	Zaheer et al., 1989
P. vera L. Antep	ç	MS + BA (8.9MikroM)	Somatik embriyojenezis	Onay et al., 1995
P. vera L. Antep	su/lt	MS + NAA	Somatik embriyojenezis	Taskin et al. 1996
P. vera L. Antep	pems	MS + BA (2)	Sentetik tohum Kapsüllü embriyojenik doku	Onay et al., 1996
P. vera L. Antep	at/lt	MS + BA MS + BA or TDZ	Organojenezis Embriyojenezis	Onay, 1996
P. vera L. Antep	ç	Liquid MS + BA or ABA	Olgunlaşma, çimlenme, Embriyo gelişimi	Onay et al., 1997
P. vera L.	kot	MS + 2,4-D (1-5) + kin 0.5-2) + NAA (0.1)	Somatik embriyojenezis	Chatibi et al., 1997
P. vera L. Antep	ypr	MS + TDZ (1-2)	Somatik embriyojenezis	Onay ve Namli, 1998
P. vera L. Antep	ot	MS + BA	Somatik embriyo çimlenmesi	Firat ve Onay, 1999
P. vera L. Antep	om/ypr	MS + BA or TDZ	Somatik embriyojenezis	Onay ve Jeffree, 2000
P. vera L. Antep	ay	MS + BA	Tek sıralı epidermal hücrelerden somatik embriyoların gelişimi	Onay, 2000c

Tablo 7. nin devamı

Türler/Anaçlar	Eksplant Kaynağı	Ortam (mg ^l)	Morfolojik cevap	Referans
<i>P. vera</i> L. Antep	Ç	MS + BA	Somatik embriyojenezis	Onay, 2000b
<i>P. vera</i> L. Antep	au/lt	MS + BA or ABA	Somatik embriyo Olgunlaşma	Onay ve ark., 2000
<i>P. vera</i> L. var. Siirt	au/lt	MS + BA or ABA	Mikroaşılama Bitkicik	Onay ve ark., 2003
<i>P. vera</i> L.	Kallus (at/lt)	Mod MS+kin(0,2) +NAA(0,2)	Uzun inkübasyondan sonra: Sürgünler (embryoidler /meristemoidler)	Barghchi(1982):Barghchi ve Alderson(1983b)
<i>P. vera</i>	at/lt	MS+BA(0,3)+IBA (0,05)	Sürgün büyümesi	Barghchi (1985): Barghchi ve Martinelli (1984)
<i>P. vera</i>	Inf	MS+2,4-D+BA	Kallus oluşumu– Bazı farklılaşmalar	Barghchi (1985): Barghchi ve Martinelli (1984)
<i>P. khinjuk</i>	at/lt	MS+BA(4)	Çoklu sürgün büyümesi	Barghchi(1982,1985a): Barghchi ve Alderson (1983b)
<i>P. khinjuk</i>	at/lt	MS+kin(0,2)+NAA (0,2)	Sürgün büyümesi-bitkicik	Barghchi(1982,1986a)
<i>P. khinjuk</i>	ze	MS+BA(4)+IBA(4)	Bitki rejenerasyonu	Tilkat et al. (2005)
<i>P. mutica</i>	at/lt	MS+BA(4)	Çoklu sürgün büyümesi	Barghchi(1982,1986a)
<i>P. mutica</i>	at/lt	MS+kin(0,2)+NAA (0,2)	Sürgün büyümesi – birkaç bitkicik	Barghchi(1982,1986a)
<i>P. atlantica</i>	at/lt	MS + BA (4)	Sürgün büyümesi	Barghchi(1982,1986a)
<i>P. palaestina</i>	at/lt	MS + BA (4)	Sürgün büyümesi	Barghchi(1982,1986a)
<i>P. terebinthus</i>	at/lt	Mod And BA (2.5)	Çoklu sürgün büyümesi	Pontikis (1984)
<i>P. terebinthus</i>	IVP sh	Mod MS + PhG (89) +IBA (1) + GA3 (0.1)	Köklenme – bitkicik	Pontikis (1984)

at: apikal tomurcuk; lt: lateral tomurcuk, ay: aseptik yaprak; au: apikal uç; BA: 6-benzlyaminopurine; kot: kotiledonlar; hs: hücre suspansiyonu; DKW: Driver-Kuniyuki-Walnut ortamı; pecc: çoğaltılabilir embriyojenik kütle; ER: Modified Eriksson medium; inf: infloresans; ypr: yaprak; om: olgunlaşmamış meyveler; ot:olgunlaşmamış tohumlar; oem: olgunlaşmamış embriyo; IAA: indol-3-asetik asit; IBA: indol-3-bütirik asit; ç: çekirdek; kin: kinetin; MeJA: Metil Jasmonat; MS: Murashige and Skoog medium; NAA: α -naftalenasetik asit; PhG: phloroglucinol; su: sürgün ucu; TDZ: Thidiazuron; yt: yan tomurcuklar; ze: zigotik embriyolar; IVP: *In vitro* üretim, Mod: Modifikasyonlar, değişiklikler.

Organojenez farklı zaman periyotlarında kök ve sürgünlerin farklılaşmalarını kapsar. Genellikle sürgünler dokularda bulunan sitokin ile teşvik edilir. Yetişkin materyalde kültür başlatılması genellikle budama, aşılama,

BA ve GA₃ püskürtme yöntemi, olgun ağaçlardaki sürgünlerin yeniden büyümelerini teşvik eder (Barghchi ve Martinelli, 1984; Barghchi ve Alderson, 1989; Gonzales ve Frutos, 1990). Olgun fıstık ağaçlarının ilk eksplantlarından gerçek aksiller sürgün oluşumu üzerine yalnızca bir araştırma bulunmaktadır (Onay 2000a). Çok sayıda sürgün üretimi; *in vitro* çoğaltılmış sürgünlerden alınan sürgün tiplerinin 1 mg^l⁻¹ BA ve Gamborg vitamini içeren katı MS ortamında kültüre alınmasıyla elde edilmiştir. Çoğaltma oranı 30. günde her bitki için 20 mikrosürgün olmuştur. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi, 2mg^l⁻¹ IBA ile MS ortamının desteklenmesi yoluyla başarılmıştır. Kısa periyotlu adaptasyondan sonra köklenmiş bitkilerin bağımsız büyümeleri sağlanmıştır.

Mikroçoğaltma yoluyla embriyojenik somatik hücrelerden embriyoların gelişimi somatik embriyojenezi gerektirir. *P. vera*'nın somatik embriyoları, başlıca zigotik embriyolardan ve olgunlaşmamış çekirdeklerden başlatılmıştır (Onay ve ark., 1995 ve Onay, 1996).

Fıstığın *in vitro* olarak mikroaşılınması *in vivo* kadar iyi araştırılmıştır (Abousalim, 1990), ancak fide olarak seçkin olgun ağaçlar kullanıldığında gençleştirmenin gerçekleşmediği görülmüştür.

Antepfıstığı (*Pistacia vera*) Siirt çeşidinin *in vitro* mikro çoğaltılmasında kullanılmak üzere, ürün veren ağaçlardan alınan eksplantların rejenerasyonu için, bir *in vitro* mikro aşılama metodu geliştirilmiş (Onay ve ark., 2003) ve bu çalışmayla budanmış ağaçlardan, köke en yakın kısımdaki yeni apikal sürgünlerden alınan eksplantların, 1 mg^l⁻¹ BA, 100 mg^l⁻¹ kazein hidrolizat, 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 8 gl⁻¹ agar içeren 1/1 konsantrasyonundaki MS besi ortamında rejenerasyona en iyi cevap verdiği tespit edilmiştir.

Mikro aşılama çalışmalarında, *in vitro* ortamda çimlenmiş zigotik embriyolardan elde edilen bitkicikler anaç olarak kullanılmış ve Antepfıstığının en kolay ve başarılı *in vitro* mikro aşılama metodunun, dar meristemli yarma mikro aşı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yine en yüksek mikro aşı başarısı, %56.85 tutma oranı ile 2-4 mm uzunluğundaki mikro çeliklerden elde edilmiş ve rejenera olmuş sürgün uçlarından alınan çeliklerin uzunluğunun 4 ile 6 mm (%89.25) arasında olduğu ve yaşayan sürgün ucu oranının, sürgünlerin ağaçtan alınma zamanlarıyla doğrudan ilişkisi bulunduğu tespit edilmiştir.

2.3.2. Besi Ortamının Seçimi

Her bitki türü için kullanılan besi ortamları benzer maddeleri içermektedir. Bunlar, organik maddeler (miyo-inositol, thiamin-HCl, adenin sülfat, piridoksin-HCl, nikotinik asit), inorganik maddeler (makro ve mikro besin elementler), bitki büyüme düzenleyicileri (oksinler, sitokininler ve gibberellinler) ile agar ve şeker gibi diğer komponentlerdir. Fakat kültür amacına ve bitki özelliğine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklikler olabilmektedir.

Kültür besi ortamlarından Murashige ve Skoog (MS) ortamının, çoğu bitkiler için hem kültür başlatılmasında hemde sürgün çoğaltımında kullanılmasında iyi sonuçlar elde edilmesine karşın, bu ortamdaki tuzların oranı bazı bitkiler için toksik yada fazla gelebilir ve bu bitkilerin kültürlerinde farklı kültür besi ortamları (WPM, Llyod, SH vb.) kullanılabilir

Fıstık ağaçlarının mikroçoğaltımı için ise genellikle Murashige ve Skoog kültür besi ortamı kullanılmıştır. (Barghchi, 1982; Martinelli, 1988; Abousalim 1990). *P. vera*'nın sürgün performansı bakımından Barghchi (1986a) tarafından MS besi ortamı ile Llyod ve McCown ve Woody Plant Medium besi ortamları arasında fark olmadığı tespit edilmiş ve bu nedenle de daha sonraki Antepfıstığının *in vitro* kültür çalışmalarında MS besi ortamı kullanılmıştır (Barghchi, 1985).

Sürgün proliferasyonunda 6 farklı temel ortama (G5, Cheng, Modifiye Ericson, Heller, White and Woody Plant) alınan fıstık dokularındaki sürgünlerin en iyi gelişmesi, filtre kağıdı köprüleri kullanılarak modifiye edilmiş Ericson sıvı ortamı kullanıldığında tespit edilmiştir (Bustamante-Garcia, 1984). Bununla birlikte sürgün çoğaltımı safhasında 4 farklı ortam kullanılarak karşılaştırmalı bir çalışma da yapılmıştır (Abousalim, 1990). *P. vera* sürgün çoğaltımı için MS ortamı ile WPM, (K) Knop ve (A) Alderson'un formülasyonları karşılaştırıldığında MS ortamının üstünlüğü ispatlanmıştır. *In vitro* ortamda kültüre alınan fıstıklarda genellikle besi ortamının sakkaroz seviyeleri ve mineral tuz içeriği (1/2 konsantrasyonda mineral tuzlar) düşürüldüğünde, köklenme oranının arttığı ortaya çıkmıştır (Barghchi, 1982; Abousalim, 1990). İyon konsantrasyonları test edilen ortamların karşılaştırılması sonucu MS'in WPM, A

ve K ortamlarından nispeten yüksek mineral tuz konsantrasyonu içerdiği saptanmıştır.

Fıstığın başarılı mikroçoğaltımı için besi ortamının modifikasyonları Parfitt ve Almedi (1994) tarafından da araştırılmıştır. Test edilen bazal ortamlardan DKW ortamı seçilmiştir. K, N, B ve Zn konsantrasyonu, 2 yaşına gelmiş sürgün çoğaltımını sağlamak üzere optimum düzeye ayarlanmıştır. Büyüme regülatörü olarak TDZ'nin kullanımı da ayrıca denenmiş, ancak olumlu sonuç alınamamıştır.

Antepfıstığının *in vitro* mikroaşılmasında aşılınmış fideler; anaçların yetiştirildiği yeni bir çimlenme (Gamborg vitaminleri, 30 gl⁻¹ sakkaroz, 0.5 mg l⁻¹ IBA ve 8 gl⁻¹ agar içeren besi ortamı), bir köklenme (Gamborg vitaminleri, 30 gl⁻¹ sakkaroz, 0.5 mg l⁻¹ BA ve 8 gl⁻¹ agar içeren besi ortamı) ve hormon içermeyen (Gamborg vitaminleri, 30 gl⁻¹ sakkaroz 8 gl⁻¹ agar içeren besi ortamı) MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Askorbik asit ile muamele edilen sürgün uçları bu ortamlarda, dar meristemli yarma mikro aşılama metodu kullanılarak, dekapite anaçlara, başarı ile aşılınmış ve gelişimlerini başarı ile tamamlamışlardır (Onay ve ark., 2003).

Yine Antepfıstığının dişi çiçek tomurcuklarından embriyojenik kallus ve somatik embriyogenezis oluşturarak bitki rejenerasyonu olanaklarının araştırıldığı başka bir çalışmada, 1 mg l⁻¹ BA destekli modifiye MS besi ortamında % 65 embriyojenik kallus oluşumu tespit edilmiş, bunun aksine TDZ ve NAA'in kültür ortamına ilavesinin somatik embriyogenezis üzerine olumsuz etki ettiği rapor edilmiştir. Somatik embriyogenezis oluşturmak için MS besi ortamı l-askorbik asit, kazein hidrolizat ve BBD'lerinin değişik kombinasyonlarında denenmiş ve her aşama için (kallus oluşumu, embriyo oluşumu, embriyo olgunlaştırma ve çimlenme aşamaları) farklı kombinasyonların etkili olduğu rapor edilmiştir (Onay ve ark., 2004).

2.3.3. Fiziksel Kültür Ortamı

Kültür şartlarının, büyüme ve gelişmeye etki edebilen diğer değişkenleri ışık ve sıcaklıktır. Fıstık eksplantlarının sürgün büyümesi ve proliferasyonu üzerine sıcaklığın etkisi Barghchi ve Alderson tarafından rapor edilmiştir ancak

20°C’de ve 25±2°C’de inkübasyona alınan *P. vera* materyallerinin büyüme ve proliferasyonunda önemli farklar görülmemiştir. Bununla birlikte büyüme ve proliferasyona sıcaklığın etkisini araştıran ikinci araştırmacı inkübasyona alınan kültürlerin sıcaklık düzeyinin 19°C’ye oranla 25°C’de tutulmasıyla performansın daha iyi olduğunu bulmuştur (Barghchi ve Alderson, 1983a ve Abousalim, 1990).

Abousalim (1990)’a göre sıcaklık/fotoperiyot davranışları da sürgün proliferasyonu üzerine etkilidir. Aynı araştırmacıya göre sürgünlerin büyümesi ve proliferasyonunun gelişimi, taze ağırlıkları kesin olmamasına rağmen 29°C/16 saatte denenmiş ve 16 saat ışık 8 saat karanlık ortamın fıstık eksplantlarının sürgün büyümesi ve proliferasyonu üzerine olumlu yanıt verdiği araştırmacı tarafından rapor edilmiştir.

2.3.4. Klonal Çoğaltım

Mikroçoğaltma, genel olarak iki metotla yapılır:

1. Organojenez
2. Somatik (non zigotik) embriyojenez

Organojeneziste; çok safhalı bir işlemden sonra köklendirilmesi gereken tek kutuplu sürgünlerin üretimi yoluyla bitkiciklerin oluşumu söz konusudur. Somatik Embriyojeneziste ise; vejetatif ya da gametik olmayan hücrelerden (bitki tomurcukları) embriyonun başlaması ve gelişmesi söz konusudur.

2.3.4.1. Organojenez yoluyla Mikroçoğaltma

Mikroçoğaltma basamakları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

1. Tohumdan ve/veya tomurcuklardan kültür başlatılması,
2. Sürgün gelişimi ve çoğaltılması,
3. Gelişmiş sürgünlerin köklendirilmesi,
4. Köklü bitkiciklerin aklimatizasyonu ve doğal şartlara alıştırılması.

2.3.4.2. Kültür Başlatılması

Kültür başlatılması için kullanılan ana eksplant tipleri tohumlar, sürgün uçları ve lateral tomurcuklardır (Barghchi 1982; Pontikis 1984; Abousalim 1990). Dekontaminasyonu sağlanmış bir bitki materyali ile kültür başlatılması, *in vitro*

çoğaltımın başarısında çok önemlidir. Fıstık tohumlarının yüzey sterilizasyonu iki safhada başarılmıştır. Bu adımların ilki tohumların %70 etanolde 45 saniye bekletilmesi, ikincisi ise % 20'lik ticari çamaşır suyu sodyum hipoklorit içinde 25 dakika bekletilmesidir (Barghchi, 1982). Ürün veren bitki materyallerinin mikroorganizmalardan arındırılmasının zor olduğu rapor edilmiştir (Barghchi ve Martinelli, 1984).

Fıstık tohumlarının yüzey sterilizasyonu bir takım vakum filtrasyon ya da çalkalayıcı kullanılarak % 1 tween ile desteklenmiş % 20'lik NaOCl'te bekletilerek başarılmıştır (Abousalim 1990).

Fıstık tohumlarının yüzey sterilizasyonunda kullanılan vakum tekniği mantar kökenli enfeksiyonların önlenmesi konusunda oldukça verimlidir. Vakum uygulanan tohumlarda mantarsal bulaşıcılara hiç rastlanmamış ve tüm enfeksiyonların bakteriyal kökenli oldukları gözlenmiştir. Çalkalayıcıların kullanıldığı tohumlarda ise, %12 ve %20 çamaşır suyu kullanıldığında, yaklaşık olarak %13.5 ve %2.7 mantarsal enfeksiyon görülmüştür (Abousalim 1990).

Genç materyallerin kültüre alınması sırasında birçok sorunla karşılaşmıştır. Bunlardan en önemlisi kahverengileşmedir. Gelişme, kahverengileşmenin olduğu kap içinde eksplantların farklı noktalara, ya da farklı kaplara taşınmasıyla tekrar sağlanmıştır (Barghchi 1985).

Dört yaşına kadar seralarda büyüyen anaç ağaçlardan alınarak kültür ortamına aktarılan eksplantların budanarak sık sık alt kültürünün yapılmasının iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Barghchi ve Martinelli, 1984). Meyve veren ağaçların kültüre alınması kahverengileşme nedeniyle zor olmuştur (Barghchi 1985).

Barghchi ve Martinelli (1984) eksplantların 10-100 mg^l-1 malonik asitle bir ön işleme tabi tutulması işleminin kahverengileşmeyi büyük ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. Budanmış, aşılansız ve BA veya GA₃ püskürtülmüş ya da mikro aşılı ağaçlardan alınan sürgünlerin kültür için çok daha uygun materyal oldukları yine aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Barghchi ve Martinelli 1984; Barghchi 1985).

Bununla birlikte; GA₃ püskürtülen ana bitkinin eksplantlarında ve genç anaçlar üzerine *in vitro* aşılansız sürgün uçlarında kültür başlatılmasında başarı

oranının düşük seviyede gerçekleştiği Barghchi (1985) tarafından gözlenmiştir. Bustamante-Garcia (1984) ise yetişkin *P. vera* ve *P. atlantica* ağaçlarından alınan lateral eksplantların *in vitro* kültür başlatılmasına yanıt vermediğini bildirmişlerdir. Yine ayrı araştırmacılara göre yetişkin *P. vera* materyallerinin gençleştirilmesi, GA₃ püskürtme, genç fideler üzerine aşılama ve 250, 500 ve 1000 ppm GA₃ kullanılması yeni sürgün ve tomurcuk oluşumunu arttırmıştır. Bu sürgünlerden lateral tomurcuk segmentleri *in vitro* kültüre olumlu yanıt vermiştir (Bustamante-Garcia 1984).

Abousalim (1990) yaptığı bir araştırmada dört yaşına kadar sera şartlarında koruma altında yetişen aşılı *P. vera* ve 25 yaşındaki dişi *P. vera* ağaçlarından almış olduğu sürgünleri (shaker) çalkalayıcı kullanılarak % 0.1 Tween 20 içeren % 20 NaOCl ile 20 dakika sterilize ettikten sonra kültüre almış ve kültür başlangıcının ilk safhalarından 3 haftaya kadar karanlıkta tutmuştur. Abousalim'e göre bu işlem besi ortamının kahverengileşmesini ve dokuların zarar görmesini sınırlamıştır (Abousalim 1990).

2.3.4.3 Sürgün Çoğaltılması

Barghchi (1982) ve Abousalim (1990)'a göre BA ile sürgün proliferasyonu kinetinden daha iyi sonuç vermiştir ve 4 mg l⁻¹ BA'nın *P. vera*'nın sürgün proliferasyonu için optimal oran olduğu saptanmıştır (Barghchi 1982; Abousalim, 1990). Barghchi bunu izleyen alt kültürlerde ortamda 4 mg l⁻¹ BA kullanılarak 35 ve 40 kadar sürgün elde ettiğini rapor etmiştir (Barghchi 1982). Düşük BA konsantrasyonları ise dört yaşındaki *P. vera* bitki materyalleri üzerinde Martinelli (1988) tarafından denenmiştir. Bir başka araştırmacı ise BA'nın düşük konsantrasyonlarının çoğaltım oranlarını aynı zamanda dört aylıktan dört yıllığa kadar olan *P. atlantica*'da (0.7 mg l⁻¹), *P. integerrima*'da (1 mg l⁻¹) olgun *P. terebinthus*'ta ise (2.5 mg l⁻¹) olarak tespit etmiştir (Pontikis 1985).

Bir başka çalışmada ise Tilkat ve ark. (2005), *Pistacia khinjuk* Stocks'un *in vitro* klonal çoğaltılması için optimal şartların, aksenik olarak geliştirilen fidelerden alınan sürgünlerin 7 gl-1 agar, 4 mg l⁻¹ BA, 100 mg l⁻¹ l-askorbik asit, 30 gl-1 sakkaroz ve Gamborg vitaminlerini içeren Murashige ve Skoog (MS) besi

ortamında kültüre alınmasıyla sağlandığını ve bu şartlarda sürgün çoğaltım oranının, kültürün 28. gününde 7.25 ± 0.95 olduğunu rapor etmişlerdir.

Barghchi ve Alderson (1985) kültür ortamına 0.05 mg l^{-1} kadar az bir NAA ekleyerek eksplantların büyümesinin inhibe olduğunu tespit etmiş ve aynı araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada ise daha yüksek konsantrasyonların *P. vera* sürgünlerinin kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. 4 mg l^{-1} BA içeren kültür ortamına $0.25-4 \text{ mg l}^{-1}$ GA₃ ya da GA₄₊₇ nin eklenmesiyle sürgün proliferasyonu ve büyümenin oluşmadığı da aynı çalışmada rapor edilmiştir (Barghchi ve Alderson, 1983a). Bustamante-Garcia (1984)'nın yaptığı başka bir çalışmada ise *P. atlantica*'da BA için optimal değer 1 mg l^{-1} dir. Aynı araştırmacılar aynı çalışmada, alt kültür için optimum şartlarda sürgün üretiminin, iki haftada bir BA+GA₃+IBA ile desteklenmiş besi ortamına taze uçların orjinal nodlarıyla birlikte transfer edilmesiyle başarılabileceğini de bildirmişlerdir (Bustamante-Garcia, 1984).

Abousalim (1990) BA'nın optimal seviyelerinin sürekli kullanımının çok küçük yapraklı bodur sürgünler ürettiğini ve bu tip materyallerin alt kültürleri esnasında arzu edilmeyen sonuçların ortaya çıktığını bildirmiştir (Abousalim 1990).

Onay ve arkadaşları (2003), Antepfıstığı (*Pistacia vera*) Siirt çeşidinin *in vitro* mikro çoğaltılmasında kullanılmak üzere, ürün veren ağaçlardan alınan eksplantların rejenerasyonu için, bir mikro aşılama metodu geliştirdiklerini ve eksplantlardan sürgün proliferasyonunu başlatmak için, eksplant tipi ve pozisyonu, sitokininin tipi ve konsantrasyonu ile besi ortamının etkileri araştırdıklarını rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda sürgün proliferasyonu için, budanmış ağaçlardan, köke en yakın kısımdaki yeni apikal sürgünlerden alınan eksplantların, 1 mg l^{-1} BA, 100 mg l^{-1} kazein hidrolizat, 30 gl^{-1} sakkaroz ve 8 gl^{-1} agar içeren 1/1 konsantrasyonundaki MS besi ortamında rejenerasyona en iyi cevap verdikleri tespit edilmiştir.

2.3.4.4. *In vitro* Köklendirme

In vitro köklendirme genellikle substrat olarak agarlı besi ortam kullanılarak yapılmıştır. Barghchi (1982) yaptığı araştırmada *in vitro* köklendirme

için en uygun oksinin IBA olduğunu tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada Barghchi köklendirmenin; ½ konsantrasyonda makro besin elementleri kullanılarak hazırlanan besi ortamına alınan eksplantların, kültürünün ilk 7 günü *in vitro* karanlık şartlar altında bekletilmesiyle ve sonunda 1-2 mm uzunluğa ulaşan köklerin oksinsiz ortama aktarılmasıyla gerçekleştirildiğini bildirmiştir.

Barghchi ve Alderson iki yaşına kadar olan *P. vera*'dan alınan eksplantlardan alınan sürgünlerin köklendirilmesinde 2.5, 3.0 ya da 3.5 mg^l⁻¹ IBA'nın kullanılmasında önemli bir farklılık olmadığını ve her üç oranda da köklenmenin yaklaşık olarak % 80 olduğunu gözlemlemişlerdir (Barghchi ve Alderson 1985).

Bununla birlikte, optimum köklenme yanıtları ortama yaklaşık olarak 1 mg^l⁻¹ ve 2 mg^l⁻¹ oranlarında IBA eklendiğinde ve köklenme için alt kültürü yapılmış eksplantlar kullanıldığında alınmış olduğu Abousalim (1990) tarafından bildirilmiştir. Bustamante-Garcia 1984'te yaptıkları bir çalışmada orjinal eksplantların köklenmesinin sıvı ya da katı NAA ve IBA ile arttırıldığını bildirmişlerdir (Bustamante-Garcia 1984). Ancak en iyi yanıtın kağıt filtre köprüleri ve NAA ile desteklenen sıvı ortam kullanıldığında elde edildiği yine aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Pontikis eksplantların olgun *P. terebinthus*'tan alındığında (%60) (Pontikis 1984) ve Martinelli dört yaşına kadar büyümüş *P.vera*'lardan alındığında (%30-40) (Martinelli 1988) daha zayıf bir köklenmenin olduğunu açıklamışlardır. Ancak buna karşın 100 mg^l⁻¹ IBA içine 10 sn batırılan mikro sürgün ve sürgün uçlarında optimum köklenmenin % 50 olduğu aynı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Zigotik embriyolardan itibaren *in vitro* çoğaltılan *Pistacia khinjuk* Stocks sürgünlerinin, köklendirilmeleri çalışmalarında 0.5 mg^l⁻¹ IBA ile destekli Murashige ve Skoog (MS) besi ortamının %100 köklenme oranıyla başarılı sonuç verdiği rapor edilmiştir (Tilkat ve ark., 2005). Ayrıca aynı araştırmacılar, tohumdan orijinlenen sürgünlerin alt kültür sayısının köklenme oranını kuvvetli bir şekilde etkilediğini bildirmişlerdir.

In vitro köklendirilen bitkiciklerin köklerinin koyu rengine rağmen, toprak-turba karışımına (%70-80) başarıyla aktarılıp yaşatıldığı ve adaptasyon için

her eksplantın bir köke sahip olmasının yeterli olduğu bildirilmiştir (Barghchi ve Alderson 1985). Bununla birlikte *P. vera* bitkiciklerinin köklendirilmesi konusunun araştırıldığı diğer deneylerde besi ortamından ayrılan bitkiciklerin sera şartlarına aktarıldıktan sonra büyümedikleri ve öldükleri Martinelli (1988) tarafından bildirilmiştir. Abousalim (1990) ise *P. vera* fidelerinden alınan sürgünlerin *in vitro* olarak köklendirilmesinin % 81.8 oranında başarıyla gerçekleştiğini rapor etmiştir (Abousalim 1990).

Onay ve arkadaşları (2003) mikroaşılama ile rejenere edilen sürgünlerin köklenmeye etkisini tespit etmek için, 25 yaşındaki ve 1 yaşındaki ağaçlar ile, *in vitro* mikroaşılama ile ve *in vitro* ikinci mikroaşılama ile rejenere edilen bitkilerden alınan, bir veya iki nodlu 15-20 mm'lik sürgün uçlarını kullanmışlar ve yüzey sterilizasyonu yapılan juvenil ve ürün veren ağaçlardan aldıkları sürgünleri direkt olarak ya da bir veya iki defa mikro aşılama ile geliştirdikleri rejenerantların köklenme kapasitelerini karşılaştırmışlardır.

Araştırmacılar tarafından, geliştirilen sürgünlerin köklenmesi için 30 gl⁻¹ sakkaroz, 1 mg l⁻¹ IBA ve 8 gl⁻¹ agar içeren MS besi ortamı kullanılmış, mikroaşılama ile rejenere edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi olduğu gözlenmekle birlikte, birinci ve ikinci mikro aşılama sonunda rejenere edilen sürgünlerin köklenme yüzdeleri arasında istatistiksel farklılıklar olmadığı görülmüştür. Elde edilen değerlerin juvenil sürgünlerde daha düşük olduğu ve IBA destekli köklenme besi ortamında kültürün 28. gününde adventif köklerin geliştiği rapor edilmiştir. Köklenmeye sürgün orijininin etkisini araştıran araştırmacılar, ürün veren 30 yıllık ağaçlardan alınan sürgünlerde köklenme oranının % 5, 1 yıllık juvenil ağaçlarda % 35, 30 yıllık ağaçlarından alınan sürgünlerin *in vitro* ortamda ilk kez mikroaşılması sonucu % 20, ikinci kez mikroaşılması sonucu ise % 25 olarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde genel materyal ve yöntemler tanımlanmıştır.

3.1. Bitkisel Materyal

Bu araştırma, Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında 2003-2006 yılları arasında yürütülmüştür.

Araştırmada bitki materyali olarak, Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü araştırma bahçelerinde yetişen dişi ağaçlarla eş zamanlı tozlaşan üstün nitelikli erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L. cv. Atlı) ağaçlarının apikal ve lateral tomurcukları kullanılmıştır. Apikal sürgün tomurcuğundan itibaren 20 cm boyunda kesilen çelikler nemli temiz bezlere sarılarak plastik kaplar içinde karanlık bir ortamda laboratuvara getirilerek deney gününe kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

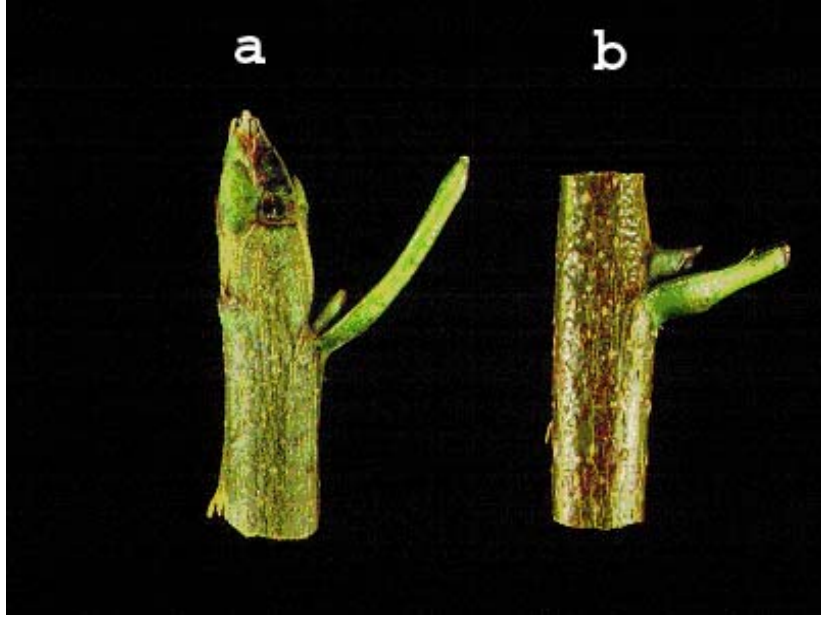
Rejenerasyon için kullanılacak sürgünler, *in vitro* koşullarda steril olarak prolifer edilmiş apikal tomurcuklardan sağlanmıştır.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Eksplant Tipleri

Çalışmamızda eksplant olarak Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü araştırma bahçelerinde yetişen dişi ağaçlarla eş zamanlı tozlaşan üstün nitelikli erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L. cv. Atlı) ağaçlarının apikal ve lateral tomurcukları kullanılmıştır (Resim 6.) *In vitro* çalışmalarımızda kullanılan materyal tiplerini şu şekilde sınıflandırabiliriz:

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

Nodal (Lateral) Tomurcuk: Vejetasyon dönemi içerisinde gelişen 1 yaşındaki sürgünler üzerinde bulunan tomurcuklardır.



Resim 6. Çalışmamızda kullanılan eksplant tipleri, (a) Apikal ve (b) Lateral Tomurcuk

3.2. Metot

3.2.1. Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

3.2.1.1. Besi Ortamının İçeriği

Sürgün proliferasyonuna besi ortam tipinin (MS, SH, WPM) etkisinin test edildiği deney haricindeki bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog (Murashige Skoog, 1962; Standart MS besi ortamı) katı besi ortamı kullanıldı (Tablo 8x).

Tüm çalışmalarda besi ortamı 5.5 gl^{-1} agar (Sigma Ltd.) ile desteklendi. Organojenez çalışmaları için kullanılan karbohidrat miktarları ve bitki düzenleyicilerinin konsantrasyonları ilgili alt bölümlerde ayrıca verilecektir.

3.2.1.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı. Standart MS besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması, aşağıda belirtilmiştir:

MS (makro elementler) ana solüsyonu

NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
Distile Su	1000 cc.'ye tamamlanır.

MS mikro 1 elementler ana solüsyonu

H ₃ BO ₃	6.2 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg
KI	0.83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.35 mg
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

MS mikro 2 elementler ana solüsyonu

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.025 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Kompleks kelatör ana solüsyonu

FeSO ₄ .7H ₂ O	5570 mg
Na ₂ EDTA	7450 mg
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

Vitamin karışımı ana solüsyonu

Nikotinik asit	0,5 mg
Glisin	2 mg
Pridoksin HCl	0,5 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

B₁ vitamini ana solüsyonu (10⁻³)

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

BA (6-Benzylaminopurin) ana solüsyonu (10^{-3})

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

NAA (α Naftalenasetik asit) ana solüsyonu (10^{-3})

NAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc.
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

IAA (İndolasetikasit) ana solüsyonu (10^{-3})

IAA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	5-10 cc.
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

IBA (3-İndolbutirik asit) ana solüsyonu (10^{-3})

IBA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc.
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) ana solüsyonu (10^{-3})

2,4-D	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	100 cc'ye tamamlanır.

Kinetin ana solüsyonu (10^{-3})

Kinetin	100 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

***myo*-inositol (10^{-3})**

<i>myo</i> -inositol	100 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

Tablo 8. Standart Murashige ve Skoog Besi Ortam İçeriği* (gl⁻¹)

Agar	5.5 g
Sakkaroz	30 g
MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc
Komplex kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
B ₁ vitamini ana solüsyonu	1 cc
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

* Tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar Sigma Ltd.'den alınmıştır.

Türlerin başarılı bir şekilde kültüre alınması için besin elementlerinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin doğru bir şekilde seçimi son derece önemli bir faktördür.

Çalışmalarda kullanılan tüm maddeler mg⁻¹ ve/veya (w/v) yüzde ile ifade edildi. Bir litre standart MS besi ortamı hazırlamak için 1 litrelik bir erlenmayer içerisine 250 ml distile saf su bırakıldı. Daha sonra belirtilen konsantrasyonda sakkaroz eklendi. Bu işlemi sırasıyla; Tablo 8.'de verilen MS ana solüsyonu (100 cc.), MS mikroelementler-1 (10 cc), MS mikroelementler-2 (1 cc.), Komplex kelatör (10 cc.), Vitamin karışımı (1 cc.) ve B₁ vitamini ana solüsyonu (1 cc.) elemanlarının belirtilen konsantrasyonlarda erlenmayer içine aktarılması izledi. Maddelerin sırasıyla eklenmesinden hemen sonra çökelmeyi önlemek amacıyla hazırlanan solüsyon birkaç dakika çalkalandı. Ortam için gerekli olan bu elemanların eklenmelerinden sonra, tüm bu karışım distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Daha sonra besi yerleri 250 ya da 500 ml'lik erlenlere aktarıldı. Bitki büyüme maddeleri (oksinler ve sitokininler) eklendikten sonra pH, 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile, 5,7 ya da 5,8'e ayarlandı. Ortamın katılaştırılması için agar eklendi ve bu karışım yine ortamın miktarına bağlı olarak 20 ya da 30 dakika, 121 °C'de 15 PSI (Pounds Per Square Inch) veya 1,03 bar basınç altında otoklavda eritildi. Eritildikten sonra agarlı besi ortamı Magenta GA 7 kaplarına aktarıldı ve besi ortamı soğuduktan sonra eksplantlar kültüre alındı. Kapakları 2 kat parafilmle sarılan kültür kapları daha sonra bölüm 3.2.4.'te kültür koşulları verilen büyüme odasına yerleştirildi.

3.2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) stok çözeltilerinin hazırlanması için, büyüme maddelerinin gerekli olan miktarları bir parça alüminyum folyo içinde tartıldı. Stok çözeltilerin tümü genellikle mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Büyüme maddeleri tartımdan sonra 50 veya 100 ml temiz balon jojeler içerisine, küçük bir magnetik karıştırıcı ile birlikte aktarıldı. Her madde az miktarlarda (5-10 ml) 1 M KOH, (TDZ, IPA, NAA, Picloram, NOA, ABA için), ya da (5-10 ml) HCl (BA, K, Zea, TDZ ve 2iP için) içinde çözdürüldü. Bazı maddeler ise (IBA, 2,4-D, 2,4,5-T, phloroglukanol) alkolde eritildi. Eritilen BBD'ler steril saf suyla, 50 veya 100 ml'ye tamamlandı.

Büyüme maddelerinin hazırlanan stok çözeltileri +4°C'de buzdolabında saklandı ve her üç haftada bir yeniden taze solüsyonlar hazırlandı.

3.2.3. Sterilizasyon Teknikleri

Bütün bitki hücre, doku ve organlarında olduğu gibi çalışmamızda kullandığımız erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) tomurcuklarının da mantar ve bakteri kökenli enfeksiyonları engellemek ve kontaminasyonlardan kaçınmak için önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi, mikropropagasyon işlemlerinde kullanılacak besi ortamı, kullanılan aletler ve kültür kaplarının da tamamen aseptik (steril) şartlar altında kullanılması son derece önemlidir.

Bu sebeple *Pistacia vera* L. tomurcukları için, en iyi yüzey sterilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gereklidir. Bununla birlikte, bu teknik tüm bu mikroorganizmaları uzaklaştıracak, bitki sistemine zarar vermeyecek ve yukarıdaki yöntemlere uygun bir teknik olmalıdır.

Çalışmamızda gerçekleştirilen bütün *in vitro* çalışmalar esnasında izlenen sterilizasyon yöntemleri aşağıda tanımlanmıştır.

3.2.3.1. Isı ile Sterilizasyon

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

1. Besi ortamı içeren erlenmayerler (ısı-labile elemanlar eksik şekilde)
2. Magenta GA-7 doku kültür kapları

3.2.3.2. Filtrasyon ile Sterilizasyon

IAA, IBA, Zea, ABA, GA₃ ve peroksidaz gibi sıcakta bozulan bileşiklerin sterilizasyonu için mikro filtrasyon yöntemi kullanılır. Belirtilen maddelerden çalışmamız süresince yalnızca IAA, IBA ve GA₃ kullanılmıştır. IAA, GA₃ ve IBA'nın sterilizasyonu için de çalışma boyunca Steril Acrodisc (0,2 µm) mikro filtre kullanılmıştır.

3.2.3.3. Kullanılan Aseptik Yöntemler

Çalışmamızda gerçekleştirilen tüm işlemler standart sterilizasyon yöntemleri izlenerek steril bir oda içindeki steril bir kabin içinde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce tek kullanımlık steril cerrahi Triflex eldivenleri giyildi. Manipulasyon sırasında düzenli olarak, ayrıca istemeden steril olmayan maddelere dokunulduktan sonra, eller % 96'lık alkol ile steril edildi.

Uzun süreli çalışmaların tümünde yüz maskesi kullanıldı. Çalışma yüzeyi her defasında kullanımdan önce teknik alkolle silindi ve 20 dk UV ışık altında bırakıldı. Bistüri uçları ve pensler kullanılmadan önce her defasında daima %96'lık alkole ve daha sonra ateşe tabi tutuldu ve steril saf suda soğutuldu.

3.2.3.4. Sterilizasyonun Korunumu

Sterilitenin sürdürülmesi için mümkün olan tüm önlemler alındı. İşlem bittiğinde otoklavda sterilize edilen maddeler steril odaya hızlı bir şekilde aktarıldı. Bu maddeler yerleştirilmeden önce tezgah yüzeyi ve erlenler teknik alkol ile silindi. Kullanımdan önce tüm çalışma yüzeyi birkaç damla Teapol solüsyonu ve teknik alkol içeren mendil ile silindi.

3.2.3.5. Pamuk ve Filtre Kağıtlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pamuklar 2 kat ambalaj kağıdına sarılıp, etüvde 180°C'de iki saat süreyle sterilizasyona tabi tutuldu. Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bisturilerin muhafazası ve üzerinde bitki parçalarının kesilmesi amacı ile iki ayrı ebatta kullanılan filtre kağıtları, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi.

3.2.3.6. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler (tüp, petri kutusu, erlen, mezür, balon joje, pipet, beher) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile iyice temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C’de etüvde iki saat bekletilmek suretiyle kurutuldu. Tamamen kurumuş olan tüplerin ağzı steril pamuklar ile kapatıldıktan sonra ambalaj kağıtları ile iki kat sarılıp etüvde 180°C’de iki saat süre ile sterilize edildi.

3.2.3.7. Pens ve Bistürilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pens ve bistüriler, önce %96’lık etil alkol ile silinip 10’arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 300°C’lik bir kuru sterilizatörde 30 dakika süre ile sterilize edildi.

3.2.4. Kültür Şartları

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

3.2.4.1. Büyüme Odası Koşulları

Büyüme odasında 30-60 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetine sahip cıvalı Flüoresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn) ve ortam sıcaklığını $25\pm 2^\circ\text{C}$ de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Ayrıca fotoperiyot, bir zaman ayarlayıcısı ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak biçimde düzenlenmiş bir ortamda kültürlerin gelişmesi için gerekli koşullar sağlandı.

3.3. Genel değerlendirme

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

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm araştırmalar 5 ana başlık altında yürütülmüş olup, bunları şöyle sıralamak mümkündür;

- a) Sterilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi çalışmaları,

- b) Kültür başlatma çalışmaları,
- c) Sürgün proliferasyon çalışmaları,
- d) Köklendirme çalışmaları,
- e) Aklimatizasyon ve tarla şartlarına aktarım çalışmaları

3.3.1. Sterilizasyon Tekniklerinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Araştırma kapsamındaki sterilizasyon çalışmalarında, %53 NaOCl içeren (Axion) ticari sterilant kullanılmıştır. Tüm sterilizasyon işlemleri röpikaj odasında yapılmış olup, çalışmalarda genellikle Magenta GA 7 kültür kapları kullanılmıştır. Standart MS besi ortamına 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 5.5 gl⁻¹ agar ilave edilerek BBD'siz olarak hazırlanmıştır. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.4.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Tüm sterilizasyon çalışmalarında yapılan gözlemler ve alınan ölçümler aşağıda belirtilmiştir;

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

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

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

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.1.1. Olgun Erkek Antepfıstığı Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Sterilizasyon Metodunun Gelişimi

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

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

3.3.1.1.1. 30 Yıllık Erkek Antepfıstığı Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl Etkisi

Bu deneyde erkek Antepfıstığı apikal ve lateral tomurcuklarından aksenik kültür başlatılmasına ve dekontaminasyonuna etkisini tespit etmek için, NaOCl'ün %5, %10, %15, %20'lik konsantrasyonları bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

15—20 mm uzunluğundaki apikal sürgünler, 30 d NaOCl'nin (v/v) %5, %10, %15 ve %20'lik çözeltileri içerisinde bir çalkalayıcı üzerinde 150rpm'de çalkalandılar. Sterilanttan çıkarılan eksplantlar 5'er dakika 3 defa steril saf su ile iyice yıkandılar. Yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantların yüzeylerindeki fazla suyun buharlaşması için üzerleri kurutma kağıtları ile kapatıldı (Standart yüzey sterilizasyon yöntemi).

Steril kurutma kağıdı üzerinde 5-10 d bekletilen apikal uçlar (4-6 mm) kültür başlatılması için 2 mg l^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alındılar. İki hafta kültür sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

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

Önceki deneyde rapor edildiği gibi erkek Antepfıstığı sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için % 10'luk NaOCl seçildi. Bu deney %10'luk NaOCl'de optimum bekletme süresini tespit etmek için, kontrol grubu ile birlikte eksplantlar 5-40 dakika arası alt bölüm 4.1.1'de sonuçları verilen standart yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu ve 2 mg l^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alındı. İki haftalık kültür sonucu elde edilen veriler Tablo 10'da verilmiştir.

3.3.1.1.3. Kültüre Alınan Eksplantların Toksik Maddelerini (Fenolikleri) Adsorbe Etmek İçin Kimyasal Madde Uygulanması

Daha önceki çalışmalarda Antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantların 20 dakika %20'lik NaOCl ve 10 dakika H_2O_2 'li sterilantlar kullanılarak başarılı bir şekilde yüzey sterilizasyonu rapor edilmiştir (Onay 1996). Çalışmamızda, yaşlı ağaçlardan alınan eksplantların yüzey sterilizasyonu, daha az işçilik gerektirmesi

ve daha ekonomik olması nedeniyle sadece NaOCl kullanılarak test edildi. Bu deney %10'luk NaOCl içinde 30 d yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantlardan salınan fenolik bileşikler adsorbe etmek ve salınımın durdurulması için yapıldı. 2 mg^l⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamına aşağıdaki kimyasal maddelerin her biri ayrı ayrı ya da karışımlarından 100'er mg^l⁻¹ eklendi: l-askorbik asit, sitrik asit ve polivinil prolidin. Deneyde 4-6 mm'lik apikal uçlar kullanıldı. Elde edilen veriler Tablo 11'de sunulmuştur.

3.3.1.1.4. Kültüre Alınan Eksplantlardan Toksik Madde (Fenolik) Salınmasının Engellenmesine H₂O₂ ve Steril Saf Suda Yıkamanın Etkisi

Bu deneyde ikili sterilizasyon (% 10'luk NaOCl'de 40 dakika sterilizasyondan sonra %10'luk H₂O₂'de 5 ya da 10 dakika çalkalama) veya % 10'luk NaOCl'de 40 dakika sterilizasyondan (her biri 5 dk üç defa steril saf suda yıkama) sonra steril saf suyla eksplantları bir yada iki defa birer saat steril saf su içerisinde 150 rpm'de çalkandı ve 2 mg^l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alındı. Elde edilen sonuçlar Tablo 12'de rapor edilmiştir.

3.3.2. Kültür Başlatılması Çalışmaları

Proliferasyon çalışmalarımızda kullanacağımız sürgünlerin elde edilebilmesi amacıyla gerçekleştirilen kültür başlatma çalışmalarında, erkek Antepfıstığı apikal ve lateral tomurcukları eksplant olarak kullanıldı. Fenolik madde salınımı engellenen ve sterilizasyonu sağlanan materyaller standart MS besi ortamlarında kültüre alındı. Magenta GA-7 kültür kaplarına 40-50 ml besi ortamı bırakıldı. Her kültür kabına apikal ve lateral tomurcuk deneyleri için 4'er tomurcuk ekimi yapıldı. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.4.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Kültür başlatma çalışmaları süresince yapılan deneylerdeki her uygulama için en az 16 eksplant kullanılmıştır. 28 günlük kültür dönemi sonucunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır.

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

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

Yaşayan Eksplant Yüzdesi: Erkek Antepfıstığı apikal yada lateral tomurcuklarının besi ortamına ekimlerinin yapılmasından sonra kültür dönemi sonunda canlı kalan eksplantların, ekimi yapılan tüm eksplant sayısına oranını (%) olarak ifade etmektedir.

Kültür başlatma çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi

Bu deneyde meristematik apikal ya da lateral uçlar (4-6 mm) sürgün proliferasyonu için kullanıldı. Tablo 12.'deki 5 no'lu işlemle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantlar, 5-10 dakika flow kabinde bekletildikten sonra 2 mg^l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında inkübe edildiler. İnkübasyondan 4 hafta sonra sürgün uzunluğu ve nod sayısı rapor edildi. Sonuçlar Tablo 13'te verilmiştir.

3.3.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin (BA, Kin) Etkisi.

Bu deneyde önceki deneyde lateral segmentlerden daha iyi sonuçlar veren erkek Antepfıstığı apikal tomurcuklarından, aksenik kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA ve Kin; herbiri 1.0 mg^l⁻¹) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

4-6 mm uzunluğundaki erkek Antepfıstığı apikal sürgünlerinden aksenik kültür başlatılması için eksplantlar, hormon içermeyen (bir kontrol grubu) ve 1'er mg^l⁻¹ BA ve Kin içeren standart MS besi ortamlarında kültüre alındı. Dört haftalık kültür sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 14'te verilmiştir.

3.3.2.3. BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Kültür Başlatılmasına Etkisi

Bu deneyde erkek Antepfıstığı apikal tomurcuklarından kültür başlatılmasına BA'nın 0.25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarının etkileri bir kontrol grubu ile birlikte test edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonlarda BA ilave edilmiş standart MS besi ortamında 4 haftalık sürgün kültür sonucu

ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri rapor edilerek istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 15'te verilmiştir.

3.3.2.4. En İyi Regenerasyon Zamanının Tespiti

Bu deneyde erkek Antepfıstığı ağaçlarının regenerasyon potansiyelinin en iyi olduğu zamanı tespit etmek için aylık periyotlarla apikal uçlardan kültür başlatılması çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 16'da verilmiştir.

3.3.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

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

Proliferasyon çalışmalarında kullanılacak materyallerin buldukları kültür kapları Steril Laminar Flow Kabin içine alınmadan önce % 96 'lık etanol ile silinerek olası kontaminasyonların önüne geçildi. 1-1.5 cm boyundaki sürgün uçları ekime uygun şekilde temizlenip hazırlanarak 40-50 ml besi ortamı içeren Magenta GA-7 kültür kaplarına konuldu. Ekim işlemleri her kültür kabı 4 adet sürgün içerecek şekilde gerçekleştirildi. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.4.1. 'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

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

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

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

Sürgün proliferasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokin (BA, Kin, TDZ) Tiplerinin Etkisi

Sürgün proliferasyonuna farklı sitokin (BA, Kin, TDZ) tiplerinin etkisinin araştırıldığı bu deneyde eksplant olarak erkek Antepfıstığı apikal sürgün uçları kullanılmıştır. Apikal sürgün uçları her biri 1.0 mg^l sitokin içeren standart MS besi ortamında kültüre alınarak hem proliferasyon çalışmaları hem de apikal sürgün uçlarının proliferasyonu için gerekli olan en iyi sitokin çeşidinin tespiti çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir.

3.3.3.2. Sürgün Proliferasyonuna Alt Kültürün Etkisi

Bu deneyde, kültür başlatılması başarı ile gerçekleştirilen apikal sürgün uçları 4 haftalık kültür süresi sonucunda farklı BA konsantrasyonları (0,675-2.0 mg^l) içeren standart MS besi ortamlarında alt kültürler alınmış ve denenen tüm BA konsantrasyonlarında yapılan birinci ve ikinci alt kültürlerin sürgün proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Her alt kültür (28 gün) sonucu, denenen tüm parametreler için sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edilmiş ve veriler istatistiksel olarak test edilmiştir. Farklı BA konsantrasyonlarında (0,675-2.0 mg^l) kültüre alınan apikal sürgün uçlarının sayıları ve uzunluklarına ait istatistiki analiz sonuçları Tablo 18’de verilmiştir.

3.3.3.3. Sürgün Proliferasyonuna BA’nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

25 yaşındaki Erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan apikal tomurcukların sürgün proliferasyon çalışmalarında, önceki deneyde alt kültürler sonucunda 2 mg^l’den düşük BA konsantrasyonlarının daha pozitif sonuçlar vermesinden dolayı 0.0675 ile 1.0 mg^l arasında değişen BA konsantrasyonlarının test edilmesine karar verilmiş ve 28 günlük kültür süresi sonucunda sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından elde edilen değerler ve bu değerlere ait istatistiksel sonuçlar Tablo 19’da verilmiştir.

3.3.3.4. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin (MS, SH, WPM) Etkisi

Erkek Antepfıstığı apikal tomurcuklarından elde edilen sürgünlerin proliferasyonuna besi ortamı tipinin (MS, SH, WPM) etkisinin araştırıldığı bu

çalışmamızda ise farklı besi ortamlarında; (besi ortamı içerikleri Tablo 20) kültüre alınan sürgünlerden elde edilen sürgün sayı ve uzunlukları Tablo 21’de verilmiştir.

3.3.3.5. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna GA₃’in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Önceki deneylerden elde edilen veriler ışığında, sürgün proliferasyonu için BA (0.5 mg^l⁻¹) oranı sabit tutularak gibberellik asitin (GA₃) farklı konsantrasyonlarını (0.05, 0.1, 0.2 ve 0.5 mg^l⁻¹) içeren kombinasyonların etkisi ayrı ayrı test edilmiş ve 4 haftalık kültür dönemi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuştur. Farklı GA₃ konsantrasyonları uygulanmış 0,5 mg^l⁻¹ BA destekli standart MS besi ortamında yetişen kültürlerin sürgün sayısı ve uzunluğu değerlerine ait istatistiki analiz sonuçları Tablo 22’de verilmiştir.

3.3.3.6. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna Oksin Tipinin Etkisi

Bu deneyde, sürgün proliferasyonunda daha önceki deneylerle optimize edilen proliferasyon koşullarının iyileştirilmesi için, 0.5 mg^l⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamına oksin ilavesinin (IAA, NAA, IBA ve 2,4-D; her biri 0.1 mg^l⁻¹) etkileri araştırıldı. Dört haftalık kültür dönemi sonucunda sürgün sayıları ve uzunlukları bakımından test edilen parametreler istatistiksel işlemlere tabi tutulmuş ve elde edilen veriler Tablo 23’te verilmiştir.

3.3.3.7. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Konsantrasyonlarının (1/4, 1/2, 1/1, 2/1 MS) Etkisi

Rejenere edilen sürgünlerin proliferasyonuna bir önceki deneyde belirlediğimiz en iyi besi ortam tipi olan MS besi ortamının farklı konsantrasyonlarının (1/4, 1/2, 1/1, 2/1) etkisinin araştırıldığı bu çalışmamızda ise farklı MS konsantrasyonlarında kültüre alınan sürgünlerden elde edilen sürgün sayı ve uzunlukları Tablo 24’te verilmiştir.

3.3.3.8. Sürgün Proliferasyonuna Karbohidrat Çeşidinin (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) Etkisi

Apikal sürgünlerden itibaren *in vitro* şartlarda sürgün gelişimi üzerine sakkaroz, Glikoz, maltoz ve fruktoz karbohidrat tiplerinin etkilerini araştırdığımız bu deneyimizde ise standart MS besi ortamında kültüre alınan her grup için 28 günlük kültür dönemi sonunda ortalama sürgün sayıları ve sürgün uzunlukları bir kontrol grubu ile birlikte test edilmiş ve sonuçlar Tablo 25'te rapor edilmiştir.

3.3.3.9. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidi (Sakkaroz) Oranlarının Etkisi

Önceki deneyde apikal sürgünlerden sürgün çoğaltılması çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen sakkaroz karbohidrat tipinin farklı konsantrasyonlarının (%2-10) etkisi de bir kontrol grubu ile birlikte bir başka deney ile test edilmiştir. 28 günlük kültür dönemi sonucunda gelişen sürgün uzunluk ve sayı değerleri istatistiksel uygulamalara tabi tutulmuş ve sonuçlar Tablo 26'da verilmiştir.

3.3.3.10. Sürgün Proliferasyonuna Poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) Etkisi

Sürgün proliferasyonuna poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) etkisinin araştırıldığı bu deneyde kullanılan apikal sürgün uçları her biri 1.0 mg^l⁻¹ poliamin içeren standart MS besi ortamında kültüre alınarak daha sonraki proliferasyon çalışmalarında kullanılabilecek en iyi poliamin çeşidinin tespiti çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 27'de verilmiştir.

3.3.4. Köklendirme Çalışmaları

Erkek Antepfıstığı apikal tomurculardan elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda 2 – 3 cm uzunluğundaki sürgünler kullanılmıştır. Sürgün altlarının 1 cm'lik kısmının yaprakları temizlendikten sonra köklenme ortamına aktarılmıştır. Ekim yapılan kültür kapları Bölüm 3.2.4.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Köklendirme deneyleri kapsamındaki uygulamaların her biri için ortalama 10 sürgün kullanılmış ve 28 günlük kültür periyodu sonunda aşağıdaki ölçümler yapılmıştır.

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

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

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

Sürgünlerin köklendirilmesi çalışmaları kapsamında aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

3.3.4.1. Bir Hafta Karanlık Uygulaması Yapılmış Sürgünlerin Köklenmelerine Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi

Bu deneyde *in vitro* şartlarda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi çalışmalarında, sürgünlerin bir hafta karanlık uygulamasına tabi tutulmasının köklenme üzerindeki etkileri test edilmiştir. Dört haftalık kültür dönemi sonunda elde edilen veriler istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve köklenme oranı (%) ile oluşan kök sayısını gösteren sonuçlar **Tablo 28**'de verilmiştir.

3.3.4.2. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi

Bu bölümde, *in vitro* şartlarda proliferasyonla çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 10 – 15 mm uzunluğundaki köklenmeye elverişli olan sürgünlerin köklenmelerine dört farklı oksininin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D; her biri 1.0 mg^l⁻¹) etkileri araştırıldı. 28 günlük kültür sonunda köklenme oranı (%) ve oluşan kök sayısı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmış ve veriler Tablo 29'da verilmiştir.

3.3.5. Aklimatizasyon Çalışmaları

In vitro'da köklenmiş erkek Antepfıstığı bitkilerinin arazi şartlarına alıştırılmasında ilk aşama olan aklimatizasyon (şaşırtma) için ticari torf (tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve sterilize edilmemiş) kullanılmıştır. Bitkiler köklenme ortamından çıkarılıp musluk suyu altında yıkanarak, su içerisinde bir süre bekletildikten sonra tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve sterilize edilmemiş ticari torf içeren plastik bardaklara dikilmişlerdir. Dikim işleminden sonra can suyu verilen bitkilerin üzerleri 50 ml'lik cam beherlerle kapatılarak Bölüm 3.2.4.1.'de belirtilen büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sulama işlemi düzenli olarak yapılmak ve ekimi yapılan bitkilerin üzeri 7. günden itibaren aşamalı olarak (7. günde 10 dakika, 8. günde 20 dakika, 9. günde 1 saat, 10. günde 2 saat, 11. günde 4 saat) açılmak suretiyle ortamın nemi kontrol altında tutulmuştur. Bu şekilde gelişmeye bırakılan bitkilerin üzerleri bir haftalık bir süre sonunda tamamen açılmıştır. Üzerleri tamamen açılan bitkiler 1 hafta daha büyüme odasında bekletildikten sonra torf ve toprak karışımı içeren saksılara aktarılarak arazi koşullarına aktarılmaya hazırlanmış ve 2-3 hafta bakım işlemleri düzenli bir şekilde yapılarak gelişmeleri sağlanmıştır.

Aklimatizasyon çalışmalarında kullanılan torf 3 şekilde sınıflandırılmış ve şöyle hazırlanmıştır;

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

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

c. Sterilize Edilmemiş Torf; sterilize edilmeden kullanılan materyali ifade etmektedir.

3.4. İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi)

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 12.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test

edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA'ya tabi tutulmuştur. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ seviyesinde *Duncan* çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Oransal veriler durumunda ise Ki kare (χ^2) testi uygulanmıştır.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

- $P > 0.05$ = önemli değil
- $P < 0.05$ = önemli
- $P < 0.01$ = çok önemli
- $P < 0.001$ = oldukça çok önemli

4. BULGULAR

Bu tezde erkek Antepfıstığı ağaçlarının *in vitro* klonal çoğaltımı için, dişi ağaçlarla eş zamanlı çiçek açan erkek ağaçlardan (25 yaşında) alınan apikal yada lateral sürgünlerin yüzey sterilizasyonu, kültür başlatılması, elde edilen rejenerantlardan yeni sürgün proliferasyonu, proliferen edilen sürgünlerin köklendirilmesi, aklimatasyonu ve tarla koşullarına aktarılması çalışmaları tanımlanmıştır. Sonuçlar bitki rejenerasyonunun safhalarına göre 5 alt bölümde sunulmuştur.

Alt bölüm 4.1 polen üreten olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan sürgün uçlarından aksenik kültürlerin başlatılmasını içermektedir. Bu alt bölümdeki deneylerin amacı doku kültürü çalışmaları için erkek Antepfıstığı ağaçlarından aksenik kültür materyali elde etmektir. Sonuç olarak deneyler, sterilant olarak kullanılan NaOCl'in farklı konsantrasyonlarını ve sterilantta bekletme süresinin, kültüre alınan eksplantların toksik maddelerini (fenolikleri) adsorbe etmek veya salınmasını engellemek için kimyasal madde uygulanmasının, H₂O₂ ve steril saf suda yıkamanın, etkilerini belirlemek için yapılmıştır.

Alt bölüm 4.2.'de olgun Antepfıstığı erkek ağaçlarından alınan apikal ya da lateral tomurcuklarından kültür başlatılması çalışmaları sunulmuştur. Bu deneyler kültür başlatılmasına, en iyi eksplant tipinin, sitokinlerin (BA, Kin), en iyi sitokin tipinin farklı konsantrasyonlarının ve yılın farklı zamanlarında alınan eksplantların etkilerini test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Alt bölüm 4.3'te, Bölüm 4.2.'de geliştirilen optimum kültür başlatma koşulları kullanılarak optimum aksillar sürgün proliferasyonu için, farklı sitokin (BA, Kin, TDZ) tiplerinin, en iyi sitokin çeşidinin farklı konsantrasyonlarının, besi ortamı tipinin (MS, SH, WPM), en iyi besi ortam tipinin farklı konsantrasyonlarının, karbohidrat çeşidinin (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz), en iyi karbohidrat çeşidinin farklı konsantrasyonlarının, alt kültürlerin, poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine), en iyi sitokin konsantrasyonuna GA₃'in farklı konsantrasyonlarının ve yine en iyi sitokin konsantrasyonuna oksin tipinin etkilerinin belirlenmesi için deneyler yapılmıştır. Metotlar, ileriki çalışmalarda kullanılmak amacıyla sürgün sayısı ve sürgün

uzunluğu bakımından daha yüksek proliferasyon oranını elde etmek için çalışılmıştır.

Alt bölüm 4.4'teki deneylerde önceki çalışmalarımızda elde edilen optimum koşullar kullanılarak çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla bir hafta karanlık periyodu uygulanmış ve uygulanmamış sürgünlerin köklenmelerine farklı oksin tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) etkisinin, en iyi oksin tipinin farklı oranlarının etkisinin tespiti için deneyler yapılmış ve sonuçlar tablolar halinde verilmiştir.

Alt bölüm 4.5'te *in vitro* köklendirilen sürgünlerin aklimitasyon çalışmaları ve *in vitro* köklendirilen, aklimitasyon çalışmaları yapılan fidelerin tarla koşullarına aktarım işlemleri yapılmıştır. Aklimatizasyon çalışmaları, iki kademedede gerçekleştirilmiştir ve 5-6 haftalık aklimatizasyondan sonra, fidecikler tarlaya aktarılmaya hazır hale getirilmişlerdir. Bu amaçla köklü sürgünlerin tam steril torf içerisinde 2-3 hafta kademeli olarak nemlilik oranı azaltılması ve 2-3 haftanın sonunda steril olmayan 1:1:1 torf : kum : toprak karışımına transfer edilmeleri aklimatizasyon başarısı açısından test edilmiştir. Sonuçlar tablo halinde verilmiştir.

Yapılan tüm deneylerden elde edilen sonuçlar tablolar halinde düzenlenmiş ve gerekli istatistiksel analizler Bölüm 3.4'te belirtildiği gibi yapılmıştır.

4.1. Olgun Erkek Antepfıstığı Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarından Yüzey Sterilizasyon Metodunun Gelişimi

Bu bölümde olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarından yapılan apikal sürgün kültüründen aksenik doku kültürü materyali elde etme süreciyle ilgili sterilant olarak kullanılan NaOCl'in etkisini araştırmak için aşağıdaki deneyler yapılmıştır:

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

4.1.1. 25 Yıllık Erkek Antepfıstığı Ağaçlarından Alınan Sürgün Uçlarının Dekontaminasyonu Üzerine NaOCl'nin Etkisi

Enfekte olan, canlı kalan ve kahverengileşen eksplantların yüzdeleri, NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 9, $P < 0.05$). Kontrol grubundaki bütün eksplantların 3 gün içinde enfekte olduğu gözlenirken 14 günlük inkübasyon sonucu %5'lik işlemde eksplantların % 15'i, %10'luk işlemde % 15'i, %15'lik işlemde % 11'i ve % 20'lik işlemde ise % 5'i enfekte olmuştur.

Tablo 9. NaOCl'nin değişik konsantrasyonlarının, 25 yıllık Antepfıstığı erkek ağaçlarından alınan eksplantlarının yüzey sterilizasyonu üzerine etkisi.

İşlemler	Enfekte Olan Eksplant (%)	Canlı kalan eksplant (%)	Kahverengileşme (%)
Kontrol	100	0	100
% 5 NaOCl	15	50	65
% 10 NaOCl	20	70	60
% 15 NaOCl	11	26	72
% 20 NaOCl	5	16	78
$\chi^2(4df)$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P > 0,05$

Rakamlar kültürün 14. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tablo 1.'deki sonuçlar, NaOCl'nin artan konsantrasyonu ile, 14 gün boyunca inkübe edilen eksplantlarda kontamine olan apikal uç yüzdesinin azaldığını ancak buna karşın NaOCl'nin artan konsantrasyonu ile inkübe edilen eksplantlarda kontamine olan apikal uç yüzdesi azalırken % 10'luk NaOCl'ten daha yüksek oranlarda (% 15 ve % 20) canlı kalan eksplant yüzdesinde azalma ve kahverengileşen eksplant sayısında ise artma görülmüştür. Bu sonuçlar da değişik konsantrasyonlarda NaOCl kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyon tekniklerinin, apikal ve lateral uçlarının dekontaminasyonu üzerine önemli bir etkisi olduğunu ve olgun Antepfıstığı ağaçlarından alınan sürgün uçlarının, % 10'luk NaOCl ile dekontamine edilebileceğini göstermektedir. Çünkü bu işlemle elde edilen dekontamine eksplant oranı daha sonraki çalışmalarda kullanılacak oranda

canlı kalan materyal yüzdesi vermiştir. Elde edilen veriler ışığında, Antepfıstığı sürgün uçlarının dekontaminasyonu %10'lık NaOCl ile başarılabilir. Ancak optimize edilen bu işlemde bile kültür ortamına salınan fenolik bileşiklerden dolayı kahverengileşen eksplant yüzdesi (% 60) oldukça yüksek oranda görülmüştür.

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

Elde edilen değerlere χ^2 testi uygulanması sonucu, enfekte olan ve yaşayan sürgün uçlarının oranlarında önemli farklılıkların mevcut olduğu görülmüştür ($P < 001$). Tablo 10'daki verilerden, eksplantların sterilizasyonunda NaOCl'de bekletme süresinin etkili olduğu açık bir şekilde görülmektedir. İmmersiyon süresinin 5 dakikadan 40 dakikaya çıkarılması eksplantların yüzey sterilizasyonuna pozitif bir etki yapmıştır. Elde edilen sonuçlarda, *in vitro* ortamda kültüre alınan 4-6 mm arası apikal ve lateral eksplantların dekontaminasyonu için, %10'luk NaOCl'de 20-40 dakika (Aralık-Mart döneminde 40 d, fakat Nisan-Mayıs döneminde en fazla 30 d) bekletmenin uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 10. Farklı immersiyon sürelerinin 25 yıllık Antepfıstığı erkek ağaçlarından alınan eksplantlarının yüzey sterilizasyonu üzerine etkisi.

İşlem	Enfekte olan kültür (%)	Yaşayan kültür (%)	Kahverengileşme (%)
Kontrol	100	0	0
5 d. %10 NaOCl	57	42	64
10 d. % 10 NaOCl	47	47	58
20 d. % 10 NaOCl	13	80	73
30 d. % 10 NaOCl	6	87	50
40 d. % 10 NaOCl	0	57	35
$\chi^2(5df)$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

Rakamlar kültürün 14. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

İmmersiyon süresinin 5 dakikadan 30 ya da 40 dakikaya uzatılması, enfekte olan kültür sayısında önemli derecede azalmaya neden olmuştur. 5 d'lık işlemden kültürlerin %57'si enfekte olurken, 40 d'lık işlemden enfekte görülmemiştir. Fakat oversterilizasyondan dolayı yaşayan kültür sayısı azalmıştır. Kültür ortamının kahverengileşmesi yine test edilen bütün işlemlerde gözlenmiştir.

4.1.3. Kültüre Alınan Eksplantların Toksik Maddelerini (Fenolikleri) Adsorbe Etmek İçin Kimyasal Madde Uygulanması

Verilere uygulanan χ^2 testi analizi sonucu kahverengileşen ve yaşayan kültür frekanslarında önemli farklılıklar olmadığı gözlenmiştir ($P < 0.01$). Ulaşılan sonuçlar, *in vitro* kültüre alınan 4-6 mm'lik apikal ve lateral eksplantların fenolik bileşiklerinin salınmasını engellemek üzere besi ortamına ilave edilen l-askorbik asit, sitrik asit ve polivinil prolidin kimyasallarının birlikte veya ayrı 100 mg⁻¹lik oranlarının uygun olmadığını göstermektedir (Tablo 11).

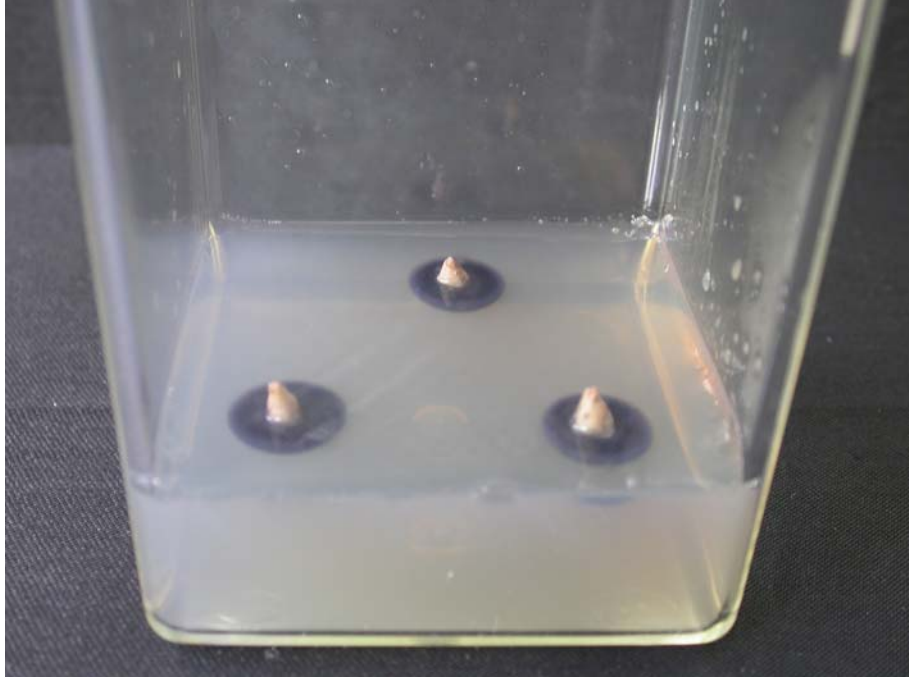
Tablo 11. Farklı kimyasal uygulamaların fenolik bileşiklerin adsorbe edilmesine etkisi.

İşlem	Kahverengileşen Kültür (%)	Yaşayan Kültür (%)
1. Kontrol	100	0.0
2. l-askorbik asit	90	10
3. Sitrik asit	85	15
4. Polivinil prolidin	90	10
5. l-askorbik asit + Sitrik asit	85	15
6. Sitrik asit + Polivinil prolidin	80	20
7. l-askorbik asit + Sitrik asit + Polivinil prolidin	90	10
$\chi^2(6df)$	$P > 0,05$	$P < 0,01$

Rakamlar kültürün 21. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tablodaki verilerden görüldüğü gibi besi ortamına kimyasal madde ilavesi ile eksplantların besi ortamına fenolik bileşik salması engellenemedi. Test edilen

işlemlerde kültürün 21. gününde çok düşük oranlarda yaşayan kültür oranları elde edildi. Test edilen bütün parametrelerde eksplantların büyük çoğunluğu kültürün 21. gününde bazal uçlarından besi ortamına fenolik salarak eksplant çevresinde siyah bir tabaka oluşturdular (Resim 7).



Resim 7. Besi Ortamına Salınan Fenolik Bileşikler

4.1.4. Kültüre Alınan Eksplantlardan Toksik Madde (Fenolik) Salınmasının Engellenmesine H₂O₂ ve Steril Saf Suda Yıkamanın Etkisi

Elde edilen değerlere χ^2 testi uygulanması sonucu, kahverengileşen ve yaşayan sürgün uçlarının frekanslarında önemli farkların mevcut olduğu ve Antepfıstığı sürgün uçlarının dekontaminasyonunun ve kültür ortamına salınan fenolik bileşiklerin salınmasının engellenmesinin başarıldığı görülmüştür (P < 001).

Tablo 12. Fenolik bileşiklerin salınmasının engellenmesine H_2O_2 ve steril saf suda yıkamanın etkisi.

İşlem	Kahverengileşen kültür (%)	Yaşayan kültür (%)
1. Kontrol	100	0
2. %10'luk NaOCl'de 40 d sterilizasyondan sonra %10'luk H_2O_2 'de 5 dakika çalkalama	70	30
3. %10'luk NaOCl'de 40 dk sterilizasyondan sonra %10'luk H_2O_2 'de 10 dakika çalkalama	70	30
4. %10'luk NaOCl'de 40 dk sterilizasyondan + 3 defa 5dk steril saf su ile yıkama + basal uçaları kesme ve bir defa steril saf suda 1 saat 150 rpm'de çalkalama	30	70
5. %10'luk NaOCl'de 40 d sterilizasyondan + 3 defa 5dk steril saf su ile yıkama + basal uçaları kesme ve iki defa steril saf suda birer saat 150 rpm'de çalkalama	0	100
$\chi^2(4df)$	P < 0,01	P < 0,01

Rakamlar kültürün 14. gününde toplam 50 eksplantın ortalamasıdır.

Tablodaki verilerden görüldüğü gibi, %10'luk NaOCl'de 40 dk yüzey sterilizasyondan sonra %10'luk H_2O_2 'de 5 ya da 10 dakikalık ikinci bir sterilant uygulaması kontrol grubuna göre etkili olmuş fakat NaOCl ile sterilizasyondan sonra bol steril saf su içinde 2 defa olmak üzere birer saat 150 rpm'de çalkalama işlemi besi ortamına salınan zararlı bileşiklerin tamamen bertaraf edilmesine neden olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda bundan sonraki çalışmalarımızda yüzey sterilizasyonu için Tablo 12'deki 5 no'lu yüzey sterilizasyon işleminin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2. Kültür Başlatılması Çalışmaları

Bu bölümde 25 yaşındaki erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan sürgün uçlarından kültür başlatılması için, kültüre alınan eksplant tipinin etkisi, sitokininlerin etkisi, en iyi sitokininin BA'ın farklı konsantrasyonlarının etkisi ve en iyi rejenerasyon potansiyeli zamanının tespiti çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalar sırasıyla ilgili alt bölümlerde verilmiştir.

4.2.1. Sürgün Ucu Kültürlerinin Başlatılmasına Eksplant Tipinin Etkisi

Sürgün ucu kültürlerinin başlatılmasına eksplant tipinin etkisinin incelendiği bu deneyde, apikal uçlardan elde edilen sürgünler daha uzun ve daha fazla sayıda olmuştur. Meristematik uçlar sürgün büyüme ortamına inoküle edildikten 3-5 gün sonra, yaprak primordiyumlarında farklılaşma gözle görülebilir hale gelmiştir. Apikal ve lateral uçların inkübasyonundan 3-5 gün sonra tomurcukların skala yapraklarında farklılaşma gözle görülür bir şekilde başlamıştır. Kültüre alınan apikal uçlarda inkübasyonun 7. gününde gözle görülür şekilde uzama belirginleşmiştir.

Tablo 13. Kültür başlatılmasına eksplant tipinin etkisi.

	Ortalama Sürgün Sayısı \pm Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm) \pm Standart Sapma
Apikal uçlar	2.26 \pm 0.21a	5.88 \pm 0,51a
Lateral uçlar	1.42 \pm 0.11b	2.94 \pm 0,26b

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

Primer yapraklar kültürün 10. gününde, sekonder yaprak oluşumu ise inkübasyonun ikinci haftasında bütün eksplantlarda görülmüştür. Bütün yaşayan eksplantlarda sürgün uçları 4 haftalık kültürde, apikal uçlar için ortalama 5.88 \pm 0,51 uzunluğunda gelişme gösterdi. Sürgün gelişmesine ilave olarak 3 haftalık

kültürde kıvrılmış yapraklar da gözlemlendi. Tablo 13.'teki verilere göre elde edilen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından apikal uçlar, lateral segmentlerden daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu nedenle de bundan sonraki çalışmalarımızda apikal uçların kullanılmasına karar verilmiştir (Resim 8).



Resim 8. Apikal meristemlerin kültüre alındıktan 3 gün sonraki genel görünüşü

4.2.2. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin (BA, Kin) Etkisi

28 günlük inkübasyon sonunda test edilen sitokinin tiplerinin, kültüre alınan eksplantların organojenez potansiyelleri üzerine belirgin bir etki yaptıkları tespit edilmiştir. Kültürlerin başlatılmasından sonra 5 günlük bir süre içerisinde sürgün uzaması ve proliferasyon görülebilir duruma gelmişlerdir. İnokülasyondan 1-2 hafta sonra bazı sürgünlerde Barghchi (1986b) nin de rapor ettiği gibi sürgün ucu nekrozu tespit edilmiştir. Ancak bunların yüzdeleri rapor edilmemiştir.

Tablo 14. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin (BA, Kin) Etkisi.

Sitokinin Tipi 1.0 mg l ⁻¹	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
Kontrol	0.18 ± 0.10c	1,30 ± 0.10b
BA	4.87 ± 0.57a	1,93 ± 0,03a
Kin	1.75 ± 0.17b	1,82 ± 0,05a

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Sürgün sayısı bakımından gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ve en fazla sürgün 4.87 ± 0.57 adet ile 1.0 mg l⁻¹ BA test grubundan elde edilmiştir. Özellikle sürgün sayısı bakımından BA ve Kontrol grubu arasında oldukça belirgin bir fark tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Sürgün uzunluğu bakımından ise test edilen gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuş ve yine BA, ortalama $1,93 \pm 0,03$ cm sürgün uzunluğu ile en iyi sonucu vermiştir (Tablo 14).

4.2.3. BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Kültür Başlatılmasına Etkisi

İlk kez kültüre alınan aksenik erkek Antepfıstığı apikal uçlarının çalışıldığı bu deneyde kültüre alınımından 10 gün içinde eksplantların apikal uçlarında veya basal taraflarında yeni sürgün oluşumlarına rastlanmıştır (Resim 9). Test edilen BA konsantrasyonları arasında, 28 günlük kültür süresi sonunda hem sürgün uzunluğu hem de sürgün uzunluğu bakımından oldukça belirgin farklılıklar gözlenmiştir. 0.5, 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların test edilen diğer parametrelere oranla çok daha fazla sayıda sürgün oluşturdukları tespit edilmiştir. Apikal tomurcuklardan kültür başlatılmasında 1.0 mg l⁻¹ BA ile destekli ortamdan ortalama 5.11 ± 0.40 sürgün sayısı ile maksimum sonuç elde edilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. BA'nın farklı konsantrasyonlarının kültür başlatılmasına etkisi.

BA konsantrasyonu (mg ^l ⁻¹)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
Kontrol	0.73 ± 0.12f	1,43 ± 0.05c
0.25	1.33 ± 0.33e	1,57 ± 0,03c
0.5	2.44 ± 0.22c	1,79 ± 0,03b
1.0	5.11 ± 0.40a	2,01 ± 0,05a
2.0	3.07 ± 0.22b	1.80 ± 0.03b
4.0	1.80 ± 0.10d	1.49 ± 0.02c
6.0	0.88 ± 0.17f	1.43 ± 0.03c
8.0	0.55 ± 0.16f	1.50 ± 0.04c
10.0	0.61 ± 0.14f	1.42 ± 0.03c
$\chi^2(9df)$		

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

En düşük ortalama sürgün sayısı ise (0.55 ± 0.16) 8.0 mg^l⁻¹ BA destekli ortamda kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, Antepfıstığının ürün veren ağaçlarından *in vitro* kültür başlatılmasında, 1.0 mg^l⁻¹ BA'la destekli MS besi ortamının kullanılmasının uygun olduğunu belirlenmiştir. 28 günlük kültür dönemi sonunda oluşan sürgün uzunluğu bakımından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından test edilen parametreler arasında da maksimum sonuç ortalama 2,01 ± 0,05 cm ile yine 1.0 mg^l⁻¹ BA destekli MS besi ortamından elde edilmiştir.



Resim 9. Kültüre alındıktan yaklaşık 10 gün sonra apikal uçlarda görülen yeni sürgün oluşumları

4.2.4. En İyi Regenerasyon Potansiyeli Zamanının Tespiti

Her ay düzenli olarak tekrarlanan (Şubat 2005’de başlandı) deneyler sonucunda en düşük başarı %20 ile Şubat ve %35 ile Mart ayında elde edilmiştir. Mayıs ayında kültüre alınan apikal tomurcuklarda, yaşayan eksplant oranının %90’a çıktığı ve Eylül ayına kadar aynı düzeyde devam ettiği tespit edilmiştir (Tablo 16).

Ortalama sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç Haziran ayında ortalama sürgün uzunluğu bakımından ise en iyi sonuç Temmuz ayında elde edilmiştir. Ancak Mayıs ve Ağustos ayları arasında kültüre alınan eksplantlardan gelişen ortalama sürgün sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Ortalama sürgün uzunluğu bakımından ise en iyi sonuçlar Mayıs, Temmuz ve Ağustos aylarında elde edilmiştir.

Tablo 16. Regenerasyon potansiyeline kültüre alınma zamanının etkisi.

Eksplant Alınış Tarihi	Yaşayan Eksplant (%)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
02.02.2005	20	1,21 ± 0,09 f	1,52 ± 0.11 f
04.03.2005	35	1.68 ± 0.10 e	2,00 ± 0.10 e
03.04.2005	85	2.52 ± 0.19 d	2,78 ± 0.18 cd
05.05.2005	90	3,15 ± 0,15 ab	3,27 ± 0.17 b
08.06.2005	90	3,31 ± 0,15 a	2,83 ± 0.20 cd
08.07.2005	90	3,10 ± 0,21 ab	3,73 ± 0.18 a
05.08.2005	90	3,10 ± 0,20 ab	3,71 ± 0.19 a
02.09.2005	90	3,03 ± 0,18 bc	2,86 ± 0.16 c
04.10.2005	50	2,82 ± 0.15 c	2,60 ± 0.12 d
02.11.2005	40	1,66 ± 0.13 e	2,00 ± 0.14 e
05.12.2005	35	1,51 ± 0.09 e	2,86 ± 0.16 f
04.01.2006	40	1,66 ± 0.10 e	1,59 ± 0.12 f
X ² (df 11)	P < 0.05		

Veriler, 1 mg l⁻¹ BA içeren MS besi ortamında 28 gün sonra alınmıştır.

Her işlem için en az 20 sürgün ucu kullanılmıştır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Ekim-Şubat dönemleri arasında kültüre alınan eksplantların ortalama % 50-65'inde regenerasyon gözlenmemiştir. Regenere olan kültürlerde ise yavaş gelişme ve elde edilen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunda azalmalar gözlenmiştir.

4.3. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

4.3.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı Sitokin (BA, Kin, TDZ) Tiplerinin Etkisi

Dört haftalık kültür dönemi sonucu elde edilen verilere göre; farklı sitokinlerle desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından sitokinler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 17).

Tablo 17. Sürgün Proliferasyonuna Sitokininlerin (BA, Kin, TDZ) Etkisi.

Sitokinin Tipi 1.0 mg ^l ⁻¹	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu ± Standart Sapma
Kontrol	1.01 ± 0.03d	1,00 ± 0,03 b
BA	3.57 ± 0.28a	2,00 ± 0,05 a
Kin	2.68 ± 0.28b	1,92 ± 0.04 a
TDZ	2.06 ± 0.17c	1,67 ± 0,14 b

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sutunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en yüksek oran 1.0 mg^l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan sağlanmıştır (3.57 ± 0.28). En düşük ortalama sürgün sayısı (2.06 ± 0.17) 1.0 mg^l⁻¹ TDZ destekli ortamda elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, Antepfıstığının ürün veren ağaçlarından *in vitro* regenere edilen sürgünlerin çoğaltılmasında, 1.0 mg^l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamının kullanılmasının uygun olduğunu belirlenmiştir (Resim 10).



Resim 10. 1 mg^l⁻¹ BA destekli MS besi ortamında kültüre alınmış apikal sürgünler

4.3.2. Sürgün Proliferasyonuna Alt Kültürün Etkisi

BA'nın farklı konsantrasyonlarıyla desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların birinci ve ikinci alt kültürlerinde, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı bakımından test edilen BA konsantrasyonları arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi (Tablo 18).

Tablo 18. Sürgün Proliferasyonuna Alt Kültürlerin Etkisi.

	BA konsantrasyonu (mg ^l ⁻¹)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
I. Kültür	2.0	1.84 ± 0.22cb	1.72 ± 0.05c
	1.0	3.11 ± 0.36a	2.16 ± 0.09a
	0.5	2.25 ± 0.25b	1.87 ± 0.07b
	0.25	2.08 ± 0.19bc	1.82 ± 0.06bc
	0.125	1.68 ± 0.15d	1.72 ± 0.03c
	0.675	1.50 ± 0.15d	1.73 ± 0.05c
II. Kültür	2.0	2.18 ± 0.11c	1.78 ± 0,04b
	1.0	2.85 ± 0.16b	1.80 ± 0.03b
	0.5	4.62 ± 0.37a	1.91 ± 0.03a
	0.25	2.75 ± 0.23b	1.58 ± 0.02c
	0.125	2.81 ± 0.22b	1.43 ± 0.02d
	0.675	2.75 ± 0.25b	1.37 ± 0,01d

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

Birinci alt kültürde sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 1.0 mg^l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamı en iyi oranı verirken, ikinci alt kültürde 0.5 mg^l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamındaki sürgün sayısı ve uzunluğunun en fazla olduğu rapor edilmiştir. Alt kültür sayısı arttıkça BA oranı 0.25 mg^l⁻¹'ye kadar aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *in vitro* regene edilen sürgünlerin alt kültürlerinde ilk aylarda 0.5 mg^l⁻¹ BA kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak artan alt kültürler sonucu (8. alt kültürden sonra) sürekli yapılan ve rapor edilmeyen gözlem sonuçlarına göre proliferasyon çalışmalarında kullanılması gereken BA konsantrasyonunun 0.5 ile 2.0 mg^l⁻¹ olduğu tespit

edilmiştir 0.5 mg l^{-1} BA destekli MS besi ortamında kültürün 28. gününde ortalama 4.62 ± 0.37 adet sürgün elde edildi (Resim 11).



Resim 11. 0.5 mg l^{-1} BA içeren MS besi ortamında kültüre alımdan (a) 28 gün sonra, (b) 21 gün sonra proliferatif olmuş sürgünler

4.3.3. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde eksplant olarak bölüm 4.3.2'de elde edilen sürgünler kullanılmıştır. Bütün kültürler alt bölüm 3.2.4.1.'de verilen koşullarda kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür sonucu oluşan sürgün sayıları ve sürgün uzunlukları rapor edildi.

BA'nın farklı konsantrasyonlarıyla desteklenen parametrelerden elde edilen sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. Verilerin analizine göre 0,5 mg^l⁻¹ BA sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu vermiştir (Tablo 19).

Tablo 19. Sürgün Proliferasyonuna BA'nın farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.

BA konsantrasyonu (mg^l⁻¹)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
1.0	2.85 ± 0.16b	1.80 ± 0.03b
0.5	4.62 ± 0.37a	1.92 ± 0.02a
0.25	2.75 ± 0.28b	1.58 ± 0.02c
0.125	2.81 ± 0.22b	1.43 ± 0.02d
0.0675	2.75 ± 0.25b	1.37 ± 0,01e

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

BA'nın farklı konsantrasyonlarıyla desteklenen standart MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda, en düşük ortalama sürgün sayısı (2.75 ± 0.25) ve sürgün uzunluğu (1.37 ± 0,01) 0.0675 mg^l⁻¹ BA destekli ortamda elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre; kültür başlatılmasından sonra en çok ikinci alt kültür sonucunda elde edilen sürgünlerin proliferasyonu için, hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonuçların 0.5 mg^l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan alındığı açıkça görülmektedir.

4.3.4. Sürgün Proliferasyonuna Besi Ortamı Tipinin (MS, SH, WPM) Etkisi

3 ve 4 defa alt kültürü yapılan sürgünler 0.5 mg l^{-1} BA ile desteklenmiş ve 5.5 gr agar ile katılaştırılmış Murashige Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) ve Shenk and Hildebrant (SH) besi ortamlarına aktarıldılar (besi ortamı çeşitleri, Sigma Ltd.'ten alınmıştır; içerikleri Tablo 20.'de verilmiştir). Her besi ortam tipi üretici firmanın önerileri doğrultusunda üzerinde yazılan miktarlarda kullanıldı. Bütün kültürler bölüm 3.2.4.'de tanımlanan kültür koşullarında yetiştirildiler.

Tablo 20. *P. vera* L.'nin sürgün proliferasyonu için kullanılan kültür ortamının mineral bileşenleri (mg l^{-1}).

Bileşenler	MS	WPM	SH
Amonyum nitrat	1650.0	400.0	-
Borik asit	6.20	6.20	5.0
Kalsiyum klorit (susuz)	332.20	72.50	200
Kalsiyum nitrat	-	386.0	-
Kobalt klorit heksahidrat	0.0250	-	0.1
Bakır sülfat pentahidrat	0.0250	0.250	0.2
Disodyum EDTA dehidrat	37.260	37.30	20
Demir sülfat heptahidrat	27.80	27.80	15
Magnezyum sülfat (susuz)	180.70	180.70	400
Manganez sülfat	-	22.30	-
Manganez sülfat monohidrat	16.90	-	10
Myo-İnositol	100.0	-	1000
Nikotinik asit	1.0	-	50
Potasyum iyodit	0.830	-	1.0
Potasyum nitrat	1900.0	-	2500
Potasyum fosfat monobazik	170.0	170.0	-
Potasyum sülfat	-	990.0	-
Piridoksin hidroklorit	1.0	-	0.5
Sodyum molibdat dehidrat	0.250	0.250	300
Tiamin hidroklorit	10.0	-	5.0
Çinko sülfat heptahidrat	8.60	8.60	1.0

Yirmi sekiz günlük kültür sonunda, test edilen 3 farklı besi ortamı arasında hem ortalama sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu bakımından istatistiksel farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Tablo 21).

Tablo 21. Sürgün Proliferasyonuna Besi ortam Tipinin (MS, WPM, SH) Etkisi.

Besi Ortamı Tipi	Ortalama Sürgün Sayısı \pm Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) \pm Standart Sapma
MS	$3.20 \pm 0.26a$	$1.97 \pm 0.10a$
WPM	$2.50 \pm 0.23b$	$1.80 \pm 0.14a$
SH	$2.33 \pm 0.20b$	$1.38 \pm 0.09b$

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

En çok sürgün MS besi ortamında elde edilirken, bu ortamın test edilen diğer iki besi ortamı ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 21). Ancak, sürgün uzunluğu bakımından MS besi ortamı ve WPM arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre; bundan sonraki çalışmalarımızda, hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu veren MS besi ortamının kullanılmasına karar verildi.

4.3.5. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna GA₃'in Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

5 veya 6 kez alt kültürü yapılan eksplantların proliferasyon çalışmalarının optimizasyonu için, elde edilen eksplantlar Bölüm 3.2.4.1.'de anlatılan koşullarda 0.5 mg l⁻¹ BA ve GA₃'in farklı konsantrasyonları (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 mg l⁻¹) ile destekli MS besi ortamında kültüre alındılar.

4 haftalık kültür dönemi sonunda elde edilen verilerin analiz sonuçlarına göre, kullanılan GA₃ oranları arasında, gelişen ortalama sürgün proliferasyonu ve sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçların, 0.5 mg l⁻¹ GA₃ ile destekli MS besi ortamından alındığı tespit edilmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna GA₃'in farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.

GA ₃ Konsantrasyonu (mg l ⁻¹)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
0.5 BA + 0.05 GA ₃	2.05 ± 1.31c	1.93 ± 0.38b
0.5 BA + 0.1 GA ₃	2.30 ± 1.08bc	1.91 ± 0.31b
0.5 BA + 0.2 GA ₃	2.35 ± 0.74ab	1.93 ± 0.30b
0.5 BA + 0.5 GA ₃	2.55 ± 0.98a	2.15 ± 0.42a

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sutunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Bu deney sonucunda olgun fıstık ağaçlarından çoğaltılan sürgünlerin proliferasyonunda BA'nın yanında GA₃ kullanılmasının etkili olduğu ve kültür başlatıldıktan sonra yaklaşık ilk sekiz alt kültür boyunca, alt kültürlerin muhafaza ve çoğaltılmasında 0.5 mg⁻¹ BA'a GA₃'ün 0.2-0.5 mg⁻¹ arasında ilave edilebileceği belirlenmiştir.

Ancak aynı besi ortamında yapılan alt kültürler sonucu 8. alt kültürden sonra elde edilen sürgünlerin yaprak morfolojilerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Özellikle yaprak renginde görülen neredeyse sarı renge varan açılmalar, internod uzamaları ve GA₃ ilave edilmemiş ortamda gelişen sürgünlerle karşılaştırıldığında daha uzun ve kayık şeklinde yaprak oluşumları gözlenmiştir.

4.3.6. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna Oksin Tipinin Etkisi

Yine sürgün proliferasyon çalışmalarının optimizasyon çalışmalarında 6 veya 8 kez alt kültürü yapılan eksplantlardan gelişen sürgünler, Bölüm 3.2.4.1.'de anlatılan koşullarda 0.5 mg⁻¹ BA ve farklı oksin tipleri (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D; her biri 0.1mg⁻¹) ile destekli MS besi ortamında kültüre alındılar.

4 haftalık inkübasyon süresi sonunda elde edilen verilerin analiz sonuçlarına göre, sürgün proliferasyonu ve sürgün sayısı bakımından kültürlere 0.5 mg⁻¹ BA yanında oksin ilavesinin (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D; her biri 0.1mg⁻¹) test edilen gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark meydana getirdiği tespit edilmiştir (Tablo 23).

Tablo 23. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna Oksin Tipinin Etkisi.

BA/OKSİN	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
0.5 BA + 0.1 IBA	2.84 ± 1.12a	2.11 ± 0.28a
0.5 BA + 0.1 IAA	2.66 ± 0.97a	1.98 ± 0.35b
0.5 BA + 0.1 NAA	2.06 ± 1.43b	1.85 ± 0.28c
0.5 BA + 0.1 2,4-D	1.46 ± 0.91c	1.76 ± 0.13c

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sutunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Sürgün sayısı bakımından 0.1 mg l^{-1} IBA ve 0.1 mg l^{-1} IAA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlar arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemesine karşın test edilen tüm gruplar arasında 0.5 mg l^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamına 0.1 mg l^{-1} IBA eklenmesinin ortalama 2.84 ± 1.12 sürgün sayısı ile en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir.

Sürgün uzunluğu bakımından ise NAA ve 2,4-D ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlar arasındaki istatistiksel fark anlamsız bulunmuş ve sürgün sayısı bakımından olduğu gibi sürgün uzunluğu bakımından da 0.5 mg l^{-1} BA ile destekli standart MS besi ortamına 0.1 mg l^{-1} IBA eklenmesinin ortalama $2.11 \pm 0.28 \text{ cm}$ sürgün uzunluğu ile en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir ancak gelişen sürgünlerin boylarının kısalması ve taban kısımlarında kallus oluşumu, proliferasyon çalışmalarında 0.5 mg l^{-1} BA' ya oksin ilavesinin olumsuz etkisini ortaya koymuş ve bu nedenle bundan sonraki proliferasyon çalışmalarında oksinlerin kullanılmasının faydalı olmayacağı kanısına varılmıştır.

4.3.7. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Besi Ortam Tipinin Farklı Konsantrasyonlarının (1/4, 1/2, 1/1, 2/1 MS) Etkisi

8 defa alt kültürü yapılmış olan sürgün uçlarının sürgün büyüme ve gelişimini test etmek için, eksplantlar 1 mg l^{-1} BA içeren MS besi ortamının 4 farklı konsantrasyonunda (1/4, 1/2, 1/1 ve 2/1) kültüre alındı. Bütün kültür koşulları bölüm 3.2.4.'de verildiği gibidir.

Tablo 24. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortam Konsantrasyonunun Etkisi.

MS Besi Ortam Konsantrasyonu	Ortalama Sürgün Sayısı \pm Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) \pm Standart Sapma
1/4 MS	$1.70 \pm 0.12b$	$1.04 \pm 0.08c$
1/2 MS	$1.70 \pm 0.14b$	$1.41 \pm 0.09b$
1/1 MS	$2.75 \pm 0.19a$	$1.99 \pm 0.10a$
2/1 MS	$1.90 \pm 0.22b$	$1.89 \pm 0.19a$

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre $P=0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Kültürün 4. haftasında rapor edilen verilere uygulanan analize göre, MS besisi ortamının farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan sürgünler, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından farklılıklar gösterdi (Tablo 24). 1/1 konsantrasyonunda kullanılan MS ortamı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucu vermiştir.

Sürgün sayısı bakımından MS'in tam konsantrasyonu (1/1) ile test edilen diğer konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar görülmüş, sürgün uzunluğu bakımından tam ve iki kat MS kullanılan parametre sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre MS besisi ortamının (1/1) tam konsantrasyonda kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.8. Sürgün Proliferasyonuna Karbohidrat Çeşidinin (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) Etkisi

Bölüm 3.2.4.'de verilen kültür koşullarında, 10 defa alt kültürü yapılmış olan apikal sürgünden elde edilen sürgün uçları 1 mg l^{-1} BA ve karbon kaynağı olarak kullanılan farklı şeker tipleri (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) ile destekli MS besisi ortamında kültüre alınmıştır.

4 haftalık kültür dönemi sonucunda alınan verilere göre, farklı şeker tipleriyle desteklenen MS besisi ortamında kültüre alınan eksplantların sürgün sayısı ve boyu bakımından test edilen işlem grupları *Duncan* testiyle karşılaştırıldığında meydana gelen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 25, $P < 0,05$). En çok sürgün, ortalama 3.00 ± 0.15 sürgün sayısı ile 30 mg l^{-1} sakkaroz destekli MS besisi ortamında elde edilirken, test edilen diğer üç ortam arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 25. Sürgün Proliferasyonuna Karbohidrat Çeşidinin
(Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) Etkisi.

Karbohidrat Çeşidi	Ortalama Sürgün Sayısı \pm Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) \pm Standart Sapma
Kontrol	1.13 \pm 0.09 c	1.86 \pm 0.05 bc
Sakkaroz	3.00 \pm 0.15 a	2.10 \pm 0.08 a
Glikoz	1.88 \pm 0.15 b	1.75 \pm 0.03 c
Maltoz	1.93 \pm 0.14 b	2.02 \pm 0.10 ab
Fruktoz	1.81 \pm 0.18 b	1.79 \pm 0.04 c

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

Sürgün uzunluğu bakımından ise test edilen karbohidrat tipleri arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve en yüksek sürgün uzunluğu ortalama 2.10 ± 0.08 cm ile sakkaroz destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan sağlanmıştır. Oluşan sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından sakkarozdan sonra en iyi ikinci sonucu veren karbohidrat tipinin maltoz olduğu tespit edilmiştir.

Test edilen dört farklı karbohidrat çeşidi arasından en iyi sonuç alınan sakkaroz, *in vitro* şartlarda apikal sürgünlerden sürgün çoğaltılması çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda MS besi ortamının bu karbohidrat çeşidi ile desteklenmesine karar verilmiştir.

4.3.9. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidi (Sakkaroz) Oranlarının Etkisi

Bu deneyde Bölüm 3.2.4.'de anlatılan kültür koşullarında, 11 defa alt kültürü yapılmış apikal sürgün uçları kullanılmıştır.

Sürgün proliferasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere MS besi ortamında kullanılacak sakkaroz konsantrasyonunu optimize etmek için, alt kültürlerden elde edilen sürgün uçları, altı farklı sakkaroz konsantrasyonunda (%)

2, % 3, % 4, % 6, % 8, % 10) bir kontrol grubu ile birlikte 1 mg^l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında kültüre alınarak test edildi.

4 haftalık kültür dönemi sonucunda rapor edilen verilerin analizlerine göre; farklı sakkaroz oranlarıyla desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan oluşan sürgün boyu ve sürgün sayısı bakımından test edilen işlem grupları Duncan testiyle karşılaştırıldığında, farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 26, P < 0,05).

Tablo 26. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.

Sakkaroz (mg ^l ⁻¹)	Ortalama Sürgün Sayısı ± Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma
Kontrol	1.26 ± 0.10c	1.64 ± 0.03cb
% 2	1.61 ± 0.02b	1.61 ± 0.02c
% 3	2.70 ± 0.20a	2.03 ± 0.05a
% 4	1.70 ± 0.14b	1.74 ± 0.03b
% 6	1.61 ± 0.16b	1.69 ± 0.03cb
% 8	1.82 ± 0.19b	1.75 ± 0.05b
% 10	1.52 ± 0.15bc	1.69 ± 0.03cb

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Sakkarozun denenen konsantrasyonlarında sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonucun (sırasıyla ortalama 2.70 ± 0.20 ve 2.03 ± 0.05) %3 sakkaroz ile desteklenen MS besi ortamından alındığı tespit edildi.

Elde edilen sonuçlar, sakkaroz'un sürgün çoğaltımını kuvvetle etkilediğini ve sürgün çoğaltımı için % 3 sakkaroz ile destekli MS besi ortamının en iyi ortam olduğunu açık bir şekilde ortaya koymuştur.

4.3.10. Sürgün Proliferasyonuna Poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) Etkisi

12 veya 13 defa alt kültürü yapılan sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında poliaminlerin etkilerini (Spermine, Spermidine ve Putrescine; her biri 1 mg l^{-1}) test etmek için, elde edilen sürgünler Bölüm 3.2.4.'de anlatılan kültür koşullarında, 1.0 mg l^{-1} BA ile desteklenmiş Murashige Skoog (MS) besi ortamında aktarıldılar.

Yirmi sekiz günlük kültür sonunda, test edilen 3 farklı poliamin arasında hem ortalama sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu bakımından istatistiksel farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Tablo 27).

Tablo 27. Sürgün Proliferasyonuna Poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) Etkisi.

Poliamin Çeşidi	Ortalama Sürgün Sayısı \pm Standart Sapma	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) \pm Standart Sapma
Spermine	$1.30 \pm 0.13b$	$1.29 \pm 0.07b$
Spermidine	$1.76 \pm 0.20a$	$1.35 \pm 0.05b$
Putrescine	$1.82 \pm 0.17a$	$1.89 \pm 0.08a$

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sutunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre $P=0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

En çok sürgün ortalama 1.82 ± 0.17 sürgün sayısı ile 1 mg l^{-1} Putrescine ile destekli MS besi ortamında elde edilirken, sürgün sayısı bakımından bu ortamın test edilen diğer ortamlardan Spermidine ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 19). Buna karşın, sürgün uzunluğu bakımından Putrescine ile destekli MS besi ortamı ile diğer poliamin tipleriyle destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ancak daha önce test edilen sitokin gruplarıyla karşılaştırıldığında, test edilen Poliamin çeşitlerinden en iyi sonuç veren Spermidine grubunda bile gelişen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerlerinin çok düşük olduğu tespit edilmiş ve daha sonraki deneylerde kullanılmamasına karar verilmiştir.

Sitokininlerle karşılaştırıldığında, poliaminlerin sürgünlerin morfolojileri üzerinde de daha az olumlu etkiler bıraktığı gözlenmiştir. Özellikle Spermidine ve Spermine grubunda oluşan sürgünlerin ortalama boy uzunluklarında azalmalar, yaprak renklerinde açılmalara ve yaprak boyutunda küçülmeler ve internod kısaltmaları gözlenmiştir.

4.4. Köklendirme Çalışmaları

Köklendirme çalışmalarında 20 ay boyunca optimum proliferasyon koşulları kullanılarak çoğaltılan sürgünler (Işık/karanlık periyodunun etkisi ile ilgili deney hariç) kullanıldı. Köklendirme çalışmalarında, bir hafta karanlık uygulaması yapılmış sürgünlerin köklenmelerine farklı oksin tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) etkisi araştırılmıştır.

4.4.1. Bir Hafta Karanlık Uygulaması Yapılmış Sürgünlerin Köklenmelerine Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi

Bu deneyde *in vitro* şartlarda 4 yada 5 kez alt kültürü yapılarak çoğaltılmış sürgünlerin köklendirilmesi çalışmalarında, sürgünlerin bir hafta karanlık uygulamasına tabi tutulmasının köklenme üzerindeki etkileri test edilmiştir. Dört haftalık kültür dönemi sonunda elde edilen veriler istatistiksel analizlere tabi tutulmuş ve köklenme oranı (%) ile oluşan kök sayısını gösteren sonuçlar Tablo 28.'de verilmiştir.

Tablo 28. Bir Hafta Karanlık Uygulaması Yapılmış Sürgünlerin Köklenmelerine Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi

Oksin Tipi (mg ^l ⁻¹)	Köklenme Oranı (%)	Kök Sayısı ± Standart Sapma
IAA	9	1.00 ± 0.00 a
IBA	17	1.50 ± 0.18 a
NAA	0	0.00 ± 0.00 b
2,4-D	0	0.00 ± 0.00 b

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre $P=0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Tablo 28.'deki verilere göre, köklenme için kültüre alınan sürgünlere 1 haftalık karanlık uygulamasının yapılmasının köklenme oranına pozitif bir etki yapmadığı tespit edilmiş ve bu nedenle köklendirme çalışmaları için farklı parametrelerin çalışılmasına karar verilmiştir.

4.4.2. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi

Dört haftalık kültür sonucunda sadece IBA ve IAA içeren standart MS besi ortamlarında köklenmenin geliştiği tespit edilmiştir. En yüksek köklenme oranı 1.0 mg l^{-1} IBA destekli standart MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden (% 53) elde edilmiştir (Tablo 29).

Tablo 29. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi.

Oksin Tipi (1.0 mg l^{-1})	Köklenme Oranı (%)	Ortalama Kök Sayısı \pm Standart Sapma
IAA	47	$1.42 \pm 0.20 \text{ b}$
IBA	53	$2.37 \pm 0.22 \text{ a}$
NAA	40	$1.20 \pm 0.10 \text{ b}$
2,4-D	20	$1.25 \pm 0.11 \text{ b}$
$X^2(4df)$		

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre $P=0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Elde edilen kök sayısı bakımından ise en iyi sonuç, ortalama 2.37 ± 0.22 kök sayısı ile yine 1.0 mg l^{-1} IBA ile desteklenmiş standart MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edilmiştir.

4.4.3. Sürgünlerin Köklenmelerine En İyi Oksin Tipinin (IBA) Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deney kapsamında, apikal tomurcukların proliferasyonu sonucu elde edilen sürgünlerin köklenmeleri üzerine en iyi oksin tipinin (IBA) farklı konsantrasyonlarının etkisi ($0,5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0$ ve 8.0 mg l^{-1}) incelenmiştir.

Tablo 30. Sürgünlerin Köklenmeleri Üzerine En İyi Oksin Tipinin (IBA) Farklı Konsantrasyonlarının (0,5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 ve 8.0 mg^l⁻¹) Etkisi

IBA Konsantrasyonu (mg ^l ⁻¹)	Köklenme Oranı (%)	Ortalama Kök Sayısı ± Standart Sapma
0.5	30	1.16 ± 0.16 b
1.0	50	1.50 ± 0.11 b
2.0	65	2.00 ± 0.15 a
4.0	40	1.37 ± 0.86 b
6.0	20	1.25 ± 0.10 b
8.0	5	1.00 ± 0.00 b

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sutunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Bölüm 3.2.4.'de anlatılan koşullarda 0,5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 ve 8.0 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen verilerin analiz sonuçlarına göre, köklenme için kullanılan oksin (IBA) konsantrasyonunun 0.5 mg^l⁻¹'den 2.0 mg^l⁻¹'ye çıkarılması köklenme oranı üzerinde olumlu etki yapmış ancak 2.0 mg^l⁻¹'den daha fazla kullanımının köklenmeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca oluşan kök sayısı bakımından da test edilen tüm parametreler içinde en iyi sonuç ortalama 2.00 ± 0.15 kök sayısı ile 2.0 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamında kültüre alınmış eksplantlardan elde edilmiştir (Tablo 30). İnokülasyondan 3 hafta sonra 2.0 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda % 65 oranında köklenme elde edilmiştir (Resim 12).



Resim 12. 2.0 mg^l IBA destekli MS besisi ortamında köklendirilmiş sürgünler

4.4.4. Kültüre Alınan Sürgünlerin Uzunluklarının Köklenme Üzerine Etkisi

Bir önceki deneyde 2 mg^l IBA destekli MS besisi ortamında köklendirilen sürgünler yine aynı oranda IBA içeren MS besisi ortamlarında bu kez, kullanılan eksplantların boylarının köklenme üzerine bir etkisinin olup olmadığını test etmek için farklı uzunluklarda (1, 2, 3 ve 4 cm) kültüre alındılar.

Tablo 31. Köklenmeye Eksplant Uzunluğunun Etkisi.

Eksplant Uzunluğu (cm)	Ortalama Kök Uzunluğu (cm) ± Standart Sapma	Ortalama Kök Sayısı ± Standart Sapma	Köklenme Oranı (%)
1	0,12 ± 0,05c	1,14 ± 0,14 c	8
2	0,30 ± 0,09c	1,46 ± 0,10 c	17
3	1,20 ± 0,26b	2,19 ± 0,10 b	45
4	3,73 ± 0,52a	3,04 ± 0,13 a	73
$\chi^2(4df)$			P < 0,05

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Her biri 2 mg^l⁻¹ IBA içeren standart MS besi ortamlarında kültüre alınan farklı uzunluklardaki sürgünler (1, 2, 3 ve 4 cm), dört haftalık kültür dönemi sonunda kök uzunluğu ve kök sayısı bakımından test edilmiş ve test edilen parametreler bakımından en iyi sonuçların, ortalama 3,04 ± 0.13 kök sayısı ve 3,73 ± 0.52 kök uzunluğu ile, 4 cm boyunda sürgünler kullanıldığında alındığı tespit edilmiştir (Tablo 31).

Elde edilen adventif kök sayısı bakımından ise en iyi sonuç, ortalama 4,05 ± 0.66 kök sayısı ile yine 4 cm boyunda kültüre alınan sürgünlerden elde edilmiştir.

4.5. Aklimatizasyon Çalışmaları

In vitro çoğaltılan bitkiciklerin aklimatizasyonu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotlu ışık yoğunluğu 30 µmol m⁻² s⁻¹ olan bir büyüme odasında yapıldı. Köklenme ortamında 28 gün kaldıktan sonra köklenmiş sürgünler musluk suyunda 1 gece boyunca yıkandıktan sonra, ticari olarak satılan torfun aklimatizasyon üzerine etkisi araştırıldı.

Bu deney organojenez yoluyla rejenere edilen materyallerin *in vitro* koşullara adaptasyonu için yapıldı. Köklenmiş fidelerin aklimatizasyonu için tam sterilize edilmiş, yarı sterilize edilmiş ve hiç sterilize edilmemiş torf kullanıldı. Üç haftalık ilk adaptasyon süresi ve toprağa aktarıldıktan 2 hafta sonra yaşayan rejenerant yüzdeleri rapor edildi. Her işlem grubu için 30 adet rejenere edilmiş fide kullanıldı. Her biri bir adet rejenere edilmiş fide içeren 7 cm. çapında plastik saksılardaki bu fidelerin üzeri 100 ml'lik beherler ile kapatıldı ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotlu ve ışık yoğunluğu 30 µ mol m⁻² s⁻¹ olan bir büyüme odasına bırakıldı. Kültür odasında beher içinde gelişen fideler 5. günde 10 dakika, 7. günde 20 dakika, 8. günde 1 saat, 9. günde 2 saat, 10. günde 4 saat açık bırakıldılar. 11. günde normal büyüme odası koşullarında 10 gün daha gelişen fideler 21. günde 1:1:1 oranında torf : kum : toprak karışımı içeren 13 cm çapında olan daha büyük saksılara transfer edildiler. Yaşayan fideler 2 hafta sonra rapor edildi. Fideler 3 günde bir sulandı.

Tablo 32. Erkek Antepfıstığı rejenerantlarının aklimitasyonuna torfun etkisi.

Torf Tipi	Yaşayan Rejenerant* (%)	Toprağa transferden sonra yaşayan rejenerant** (%)
Tam steril	90	95
Yarı steril	62	90
Non steril	10	90
χ^2 (df 2)	P < 0,01	P > 0,05

*Soniçlar aklimitasyonun 21. gününde 30 rejenerantın yüzdesini gösterir

** Sonuçlar toprağa aktarımın 14. gününde yaşayabilen rejenerantın yüzdesini gösterir

Aklimatizasyon ve toprağa transferden sonra yaşayan fide yüzdeleri Tablo 32.'de verilmiştir. Verilere Ki kare (χ^2) testi uygulandığında kullanılan torf formları arasında 21 günlük aklimatizasyon süresi sonunda yaşayan rejenerant yüzdelерinde istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görülmüştür. Tam steril torf kullanıldığında fidelerin % 90'ü aklimatize olurken yarı steril torf formundaki fidelerin % 62'si başarılı bir şekilde aklimatize edildi. Buna karşın sterilize edilmeyen fidelerin sadece % 10'unun aklimatize olduğu görüldü. Sadece sterilize edilmeyen torf içinde yetiştirilen fidelerde mantar kökenli enfeksiyonlar görüldü.

% 90 \pm 5 bağıl nemi korumak için fidelerin üzerleri en az iki hafta boyunca Pyrex beher ya da naylon poşetlerle kapatıldı. Daha sonra fideler sera şartlarına adaptasyondan önce, bağıl nem derece derece yaklaşık % 60 \pm 5'e düşürüldü. Bu fidelere düzenli olarak 3 günde bir su verildi (Resim 13).



Resim 13. Büyüme odasında tam steril 1:1:1 toprak:kum:torf karışımında aklimatizasyona tabi tutulan bitkiciklerin 14. günde görünüşleri

Tüm fideler ayrı ayrı saksılar içinde büyüme odasında gece gündüz sıcaklığı 24°C'ye ayarlanan 16/24 saat fotoperiyot ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında gelişmelerine devam ettiler. Üç haftalık kademeli aklimatizasyondan sonra 1:1:1 oranlarındaki torf : kum : toprak karışımına aktarılan rejenerantların yüzde doksan beşi büyüme ve gelişme göstermiştir. 1:1:1 oranında torf : kum : toprak karışımı içeren saksılara aktarılan bitkiler bir büyüme odasında 2 haftalık bir süre sonunda iyi gelişmiş yeni sürgünler oluşturdular ve 5-6 haftalık aklimatizasyondan sonra ise, fidecikler tarlaya aktarılmaya hazır hale geldiler (Resim 14).



Resim 14. 5-6 haftalık aklimatizasyondan sonra doğal şartlara aktarılmaya hazır fideler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, ülkemiz ve dünya ekonomisi için çok önemli bir kültür bitkisi olan Antepfıstığı'nın (*Pistacia vera* L.) yetiştirilmesinde ve ticaretinde görülen önemli problemlerden biri olan içi boş meyve oluşumunun (fis meyve) engellenmesi yoluyla, bu bitki türünün milli gelirimize katkısını artırmak ve üstün karakterli varyetelerden oluşan meyve bahçelerinin tesisi için dişi ağaçlar ile aynı zamanda tozlaşan üstün nitelikli erkek ağaçların klonlanmasında rutin olarak kullanılabilen bir *in vitro* çoğaltım metodu geliştirmektir.

Geliştirdiğimiz bu metodu beş ana başlık altında toplayabiliriz;

- * Materyalin Sterilizasyonu
- * Kültür Başlatılması
- * Sürgün Proliferasyonu
- * Köklendirme Çalışmaları
- * Aklimatizasyon ve Tarla Şartlarına Aktarım Çalışmaları

Aşağıda; yukarıda da belirttiğimiz çalışma başlıkları ile ilgili genel değerlendirme ve tartışmalar ayrı ayrı başlıklar halinde sunulmuştur.

5.1. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Etkili bir yüzey sterilizasyon metodu *in vitro* klonal çoğaltım için geliştirilecek olan bir protokolün ilk ve en önemli aşamasıdır.

Çalışmamızda olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarının meristematik apikal ve lateral uçlarından aksenik eksplantlar geliştirmek için etkili bir yüzey sterilizasyon metodu geliştirildi.

In vitro klonal çoğaltım için, üzerinde çalışılan tüm bitki türlerinin yüzey sterilizasyonu piyasada kolaylıkla bulunan ve etkin maddesi ile klor iyon yüzdesi bilinen her türlü sterilant ile başarılabilir.

Olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarının apikal uçlarının yüzey sterilizasyonu ile ilgili çalışmalarda farklı sterilant, konsantrasyon, bekletme süresi ve bazı durumlarda da ön sterilizasyon işlemlerinin uygulandığı rapor edilmiştir.

Birçok araştırmacı tarafından (Barghchi, 1982; Bustamante Garcia, 1984; Abousalim, 1990 ve Onay, 1996) Antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantlarda

oluşan mantar ve bakteri kökenli kontaminantların, *in vitro* çalışmaların başlatılması ve sürdürülebilirliğinde önemli bir sorun teşkil ettiği rapor edilmiştir.

Barghchi (1982) olgun Antepfıstığı tohumlarından yetiştirilen fidelerin yüzey sterilizasyonunun % 70'lik etanolde 45 sn'lik bir ön işlemden sonra % 20 w/v'lük NaOCl'te 25 dakika ile başarıldığını rapor etmiştir.

Yine aynı araştırmacı tarafından serada yetiştirilen bitkilerden alınan sürgün ucu ve lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonunun, % 70'lik etanolde 45 saniyelik bir ön sterilizasyondan sonra, eksplantların % 20'lik ticari NaOCl 'te 10-15 dakika bekletilmesi ve daha sonra ise 3 defa steril distile su ile çalkalanması yoluyla başarıldığını rapor etmiştir (Barghchi, 1985).

Ayrıca anaç olarak kullanılan diğer bir *Pistacia* türü *P. atlantica*'nın olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonunun üç aşamalı bir işlemle yapıldığı Onay (1999) tarafından rapor edilmiştir.

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

Olgun Antepfıstığı ağaçlarından alınan materyallerin yüzey sterilizasyonu ile ilgili ilk veriler Abousalim (1990) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacı, 30 yıllık Antepfıstığı ağaçlarından alınan aktif olarak büyüyen sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunun, % 20'lik cholorox ile 20 dakika çalkalama ve daha sonrasında ise 3 defa steril saf su ile çalkalama işlemi ile başarıldığını bildirmiştir.

Parfitt ve Almehdi (1994), *In vitro* ortamda yetişen bitkilerin fotosentezini teşvik etmek için ışık miktarını arttırarak % 2'lik atmosferik CO₂ kullanılmasıyla kontaminasyonun kontrol edildiğini rapor etmişlerdir.

Onay (2000a), olgun Antepfıstığı dişi ağaçlarından sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunun, mutlak alkolde 2 dakikalık bir ön işlemden sonra % 20'lik NaOCl'te 10-30 dakika çalkalanarak yapıldığını rapor etmişlerdir.

Benzer şekilde gerek Antepfıstığında ve gerekse de diğer türlerin *in vitro* kültürlerinde birçok eksplant türünün dekontaminasyonu için belirli oranlarda seyreltilmiş NaOCl (Axion ve Domestos gibi ticari çamaşır suları) içeren dezenfektanlar yüzey sterilizasyon işlemlerinde başarılı bir şekilde

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

Çalışmamızda erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının tomurcuklarından itibaren aksenik eksplant çoğaltımı için etkili bir yüzey sterilizasyonu geliştirildi.

Erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan tomurcukların yüzey sterilizasyonu % 53'lük klor içeren NaOCl kullanılarak her hangi bir ön sterilizasyon işlemi uygulanmaksızın, eksplantın alındığı tarihe de bağlı olarak, % 10'luk NaOCl'de 20-45 dakika bekletilerek elde edildi.

Mart–Nisan-Mayıs aylarındaki yeni sürgünlerin yüzey sterilizasyonu süresinin daha kısa süreli olması gerektiği (20 dakika), Kasım-Aralık-Ocak döneminde alınan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için ise NaOCl'de bekletilme süresinin 45 dakikaya kadar uzatılması gerektiği tespit edilmiştir.

Eksplantların % 10'luk NaOCl'de 45 dakikanın üzerinde bekletilmesi ile yapılan yüzey sterilizasyonu işlemlerinde, materyallerin tamamına yakınında doku ölümleri gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Onay (1996) tarafından da rapor edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda *in vitro* ortamda kültüre alınan 4-6 mm arası apikal ve lateral olgun erkek Antepfıstığı sürgünlerinin yüzey sterilizasyonunun, %10'luk NaOCl'de 20-40 dakika (Aralık-Mart döneminde 40 d, fakat Nisan-Mayıs döneminde en fazla 30 d) bekletme ve sonrasında 3 defa 5dk steril saf su ile çalkalama işlemi ile başarılılabileceği tespit edilmiştir.

5.2. Kültür Başlatılması ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

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

Onay (2000a), 25 yaşındaki ligninleşmiş Antepfıstığı ağaçlarından alınan 3-4 cm'lik apikal ve lateral tomurcukların kesik uçlarını, BBD'lerinden BA içerisine birkaç dakika daldırıldıktan sonra sürgün gelişmesi için sera ortamında torf ve toprak içeren saksılara bırakılmıştır. Yine aynı araştırmacı, birkaç gün boyunca uygun sıcaklık ve nem ortamı sağlanan serada gelişmeye zorlanan apikal ve lateral uçlardan gelişen yeni sürgünlerin, *in vitro* kültür başlatılmasında kullanılacak en etkin eksplantlar olduğunu rapor etmiştir.

Onay ve arkadaşları (2003), Antepfıstığından kültür başlatılmasında kullanılacak eksplantın olgun ağaçlardan alınış tarihinin önemi ile ilgili yaptıkları bir diğer çalışmada ise; rejenere edilmiş sürgün uçlarından alınan çelik uzunluklarının ve sürgünlerin ağaçtan alınma zamanlarının kültür başlatılması üzerinde doğrudan etkileri olduğunu, kullanılacak optimum mikroçelik uzunluklarının 4-6 mm arasında; sürgünlerin anaç ağaçtan alınma zamanının en iyi olduğu dönemin ise Mart-Mayıs ayları olduğunu tespit etmişlerdir.

Onay (2000a)'ın, doğal koşullarda gelişmeye zorlanan apikal ve lateral uçlardan gelişen yeni sürgünlerin, *in vitro* kültür başlatılmasında kullanılacak en etkin eksplantlar olduğu raporuna paralel olarak, çalışmamızda kültüre alınan sürgünler sera koşullarından ziyade direkt olarak *in vitro* kültür ortamında gelişmeye zorlanmışlardır. Bir haftalık kültür sonucu skala yaprakların ayıklanmasından sonra tekrar kültüre alınımı sürgün gelişimini hızlandırmıştır.

Olgun Antepfıstığı ağaçlarından alınan materyallerin kültüre alınması ve bu eksplantlardan *in vitro* kültür başlatılması sırasında birçok sorunla karşılaşıldığı ve bunlardan en önemlisinin kahverengileşme olduğu Barghchi (1986) tarafından rapor edilmiştir. Yine aynı araştırmacı kahverengileşmenin olduğu kap içinde eksplantların farklı noktalara, ya da farklı kaplara taşınmasıyla gelişmenin tekrar sağlandığını rapor etmiştir.

Yalpani ve Tyman (1983) adlı araştırmacılar, *Pistacia vera*'nın dış yeşil kabuklarından elde ettikleri ekstrakta anacardic acid, cardol ve C₁₇'den oluşan bir fenolik asit karışımına rastladıklarını rapor etmişlerdir.

Yine başka bir araştırmacı Barghchi ve Martinelli (1984), dört yaşına kadar seralarda büyütülmüş anaç ağaçlardan alınan eksplantların kahverengileşme

gerçekleştikçe sık sık alt kültürünün yapılmasının iyi sonuç verdiğini rapor etmiştir.

Olgun ve meyve veren ağaçlardan alınan eksplantların ise kültüre alınmasının kahverengileşme nedeniyle zor olduğu Barghchi (1985) tarafından rapor edilmiştir.

Barghchi ve Martinelli (1984) adlı araştırmacılar da sterilizasyondan sonra ve kültüre alımdan önce eksplantların 10-100 mg^l⁻¹ malonik asitle bir ön işleme tabi tutulmasının kahverengileşmeyi büyük ölçüde azalttığını ancak önüne geçemediğini rapor etmişlerdir.

Yine aynı araştırmacılar tarafından *in vitro* kültür başlatılması için budanmış, aşılansız, BA veya GA₃ püskürtülmüş ya da mikro aşılı ağaçlardan alınan sürgünlerin çok daha uygun materyal oldukları bildirilmiştir (Barghchi ve Martinelli 1984; Barghchi 1985).

Barghchi (1985) ayrıca 2 yaşına kadar sera şartlarında büyütülen *Pistacia* cinsine ait farklı kültüvarlardan {Kerman (dişi), Peters (erkek), Lambertin (dişi ve erkek), Naz (erkek), Red Aleppo (erkek), Ask (erkek) ve Rashti (erkek)} aldığı apikal ve lateral tomurcuklardan itibaren *in vitro* kültür başlatma çalışmalarında; 0,3 mg^l⁻¹ BA ve/veya 0.5 mg^l⁻¹ IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında fenolik bileşiklerin salınmasının, 2 mg^l⁻¹ BA ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlara oranlar daha az oranda gerçekleştiğini rapor etmiştir.

Olgun *P. vera* ve *P. atlantica* ağaçlarından alınan lateral eksplantların tek başına *in vitro* kültür başlatılmasına yanıt vermediği; yetişkin *P. vera* materyallerinin gençleştirilmesi, GA₃ püskürtme, genç fideler üzerine aşılama gibi metotlar uygulandığında yeni sürgün ve tomurcuk oluşumunu arttığı ve gelişen bu sürgünlerden lateral tomurcuk segmentlerinin *in vitro* kültüre olumlu yanıt verdiği Bustamante-Garcia (1984) tarafından rapor edilmiştir.

Abousalim (1990) yaptığı başka bir araştırmada ise dört yaşına kadar sera şartlarında koruma altında yetişen aşılı *P. vera* ve 25 yaşındaki *P. vera* ağaçlarından almış olduğu sürgünleri (shaker) karıştırıcı kullanılarak % 0.1 Tween 20 içeren % 20 NaOCl ile 20 dakika sterilize ettikten sonra kültüre almış ve kültür başlangıcının ilk safhalarından 3 haftaya kadar karanlıkta tutmuştur. Abousalim'e

göre bu işlem besi ortamının kahverengileşmesini ve dokuların zarar görmesini sınırlamıştır.

Çalışmamızda ise kültüre alınan eksplantlardan besi ortamına salınan toksik maddeleri (fenolikleri) adsorbe etmek ve kahverengileşmeyi önlemek için kimyasal madde uygulanmasının (l-askorbik asit, sitrik asit ve polivinil prolidin) etkisi ile H₂O₂ ve steril saf suda yıkamanın etkisi test edilmiş, kimyasal madde ve H₂O₂ uygulamalarından olumlu sonuçlar alınmış fakat bu sonuçlar istenilen miktar ve nitelikte olmamıştır. Ancak sonuç olarak steril saf suda yıkamanın etkisini araştırdığımız çalışma ile, kültür başlatılmasında ortaya çıkan kahverengileşme, daha önce geliştirdiğimiz yüzey sterilizasyonundan sonra basal uçları kesme ve iki defa steril saf suda birer saat 150 rpm’de çalkalama işlemi ile önlenmiştir.

25 yaşındaki olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarına ait meristematik apikal yada lateral uçlardan (4-6 mm) sürgün ucu kültürlerinin başlatılmasına eksplant tipinin etkisini test ettiğimiz çalışmamızda ise daha önce geliştirdiğimiz yüzey sterilizasyon metoduna tabi tutulan eksplantlar, 1.0 mg l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda apikal uçların kültür başlatılması için hem ortalama sürgün sayısı hemde ortalama sürgün uzunluğu bakımından daha elverişli eksplantlar olduğu tespit edilmiştir.

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

Onay (2000a) BA veya 2iP’nin farklı konsantrasyonlu MS besi ortamında olgun Antepfıstığı sürgün uçlarından kültür başlatma ile ilgili yaptığı çalışmada BA’m 2iP’den daha iyi sonuç verdiğini ve ayrıca 0,5-2.0 mg l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamında elde edilen yeni sürgünler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit etmiştir.

Çalışmamızda kullanılacak aksenik sürgün uçlarını elde etmek ve sürgün ucu kültürlerinin başlatılması için eksplant tipinin etkisini incelediğimiz çalışmada 25 yaşındaki erkek Antepfıstığı ağaçlarına ait apikal tomurcuklar lateral segmentlerden daha iyi sonuçlar vermiştir (Tablo 13). Aksenik kültür başlatılmasına sitokinlerin (BA ve Kin; herbiri 1.0 mg^l⁻¹) etkisini bir kontrol grubu ile test ettiğimiz çalışmamızda ise, açılan tomurcuklardan yeni gelişen sürgünlerin uzunlukları ve oluşturdukları yeni sürgün sayıları bakımından 1.0 mg^l⁻¹ BA ile desteklenmiş standart MS besi ortamının en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir (Tablo 14).

Bu çalışmaların ışığında yaptığımız kültür başlatma çalışmalarında test edilen farklı BA konsantrasyonları arasında (0.25-10.0 mg^l⁻¹) en iyi sonuç yine 1.0 mg^l⁻¹ BA destekli MS besi ortamından elde edilirken, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,5, 1.0 ve 2.0 mg^l⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda (ortalama 1 cm), test edilen diğer parametrelere göre daha fazla ve daha uzun sürgün oluşumları tespit edilmiştir (Tablo 15). Oysa BA'nın yüksek konsantrasyonlarıyla desteklenen besi ortamlarında gelişen sürgünlerin cılız, zayıf ve sayıca daha az olduğu ve tabanlarında oluşan kallusların daha büyük olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalarımızda test ettiğimiz bütün sitokin konsantrasyonlarında sürgün tabanlarında sürekli olarak büyüyen bir kallus kitlesi tespit edildi. Benzer bulgular Barghchi-Alderson (1983a) ve Onay (1996) tarafından da rapor edilmiştir.

Test edilen BA'nın değişik konsantrasyonlarında en fazla sürgün sayısı ortalama 5.11 ± 0.40 ve en uzun sürgün ise ortalama $1,01 \pm 0,05$ cm ile 1 mg^l⁻¹ BA ile destekli standart MS besi ortamında tespit edilmiştir (Tablo 15).

Çalışma sonuçlarımızı destekler bir şekilde Barghchi ve Alderson (1983b) farklı Antepfıstığı türlerinin tohumlarının *in vitro* çoğaltımı konusunda yaptıkları ön çalışmada BA'nın en iyi sonucu verdiğini rapor etmişlerdir.

Ayrıca çalışmamızda, olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantlardan kültür başlatılması çalışmalarında şimdiye kadar yapılmamış olan kültür başlatılması için en iyi regenerasyon potansiyeli zamanının tespiti araştırması da yapılmıştır. Regenerasyon potansiyeline kültüre alınma zamanının

etkisini test ettiğimiz çalışmada Mayıs ayında kültüre alınan apikal tomurcuklarda, yaşayan eksplant oranının %90'a çıktığı ve Eylül ayına kadar aynı düzeyde devam ettiği tespit edilmiştir (Tablo 16).

5.3. Sürgün Proliferasyonu ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Antepfıstığı'nın olgun tohumlarından elde edilen aksenik sürgünlerin *in vitro* çoğaltımı çalışmaları ilk kez Barghchi (1982) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yine aynı araştırmacıya ve Abousalim (1990)'a göre sürgün proliferasyon çalışmalarında BA'nın kullanımı kinetine oranla daha iyi sonuç vermiş ve 4 mg l^{-1} BA'nın *P. vera*'nın sürgün proliferasyonu için optimal oran olduğu saptanmıştır (Barghchi 1982; Abousalim, 1990).

Onay (1996) meyve veren Antepfıstığı ağaçlarından apikal ve lateral tomurcuklardan elde ettiği sürgünlerin proliferasyonunda sitokinlerden BA'nın Kin, 2iP ve Zeatin'e göre daha iyi sonuç verdiği ve BA sürgün proliferasyonunda $2-4 \text{ mg l}^{-1}$ aralığında optimal değerde kullanılabileceğini rapor etmiştir.

Çalışmamızda ise 25 yıllık olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarından alınan apikal ve lateral tomurcuklardan elde edilen sürgünlerin proliferasyonu için test ettiğimiz sitokin tipleri içinde BA, Kinetin ve TDZ'ye oranla daha iyi sonuç vermiş (Tablo 17) ve sürgün proliferasyon çalışmalarında BA'nın $0,25-2.0 \text{ mg l}^{-1}$ aralığında optimum sürgün çoğalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

Barghchi kültür başlatılmasını izleyen alt kültürlerde ortama 4 mg l^{-1} BA eklenmesiyle 35-40 kadar sürgün elde ettiğini rapor etmiştir (Barghchi 1982). Düşük BA konsantrasyonları ise dört yaşındaki *P. vera* bitki materyalleri üzerinde Martinelli (1988) tarafından denenmiştir. Bir diğer araştırmacı Pontikis (1984) ise BA'nın düşük konsantrasyonlarının çoğaltım oranlarını aynı zamanda dört aylıktan dört yıllığa kadar olan *P. atlantica*'da (0.7 mg l^{-1}), *P. integerrima*'da (1 mg l^{-1}) olgun *P. terebinthus*'ta ise (2.5 mg l^{-1}) olarak tespit etmiştir (Pontikis 1985).

Barghchi ve Alderson kültür ortamına az bir miktarda (0.05 mg l^{-1} oranında) NAA ilavesinin kültüre alınan eksplantların büyümesini inhibe ettiğini rapor etmiş (Barghchi ve Alderson, 1985) ve aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise NAA'nın yüksek konsantrasyonlarının *P. vera* sürgünlerinde kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. 4 mg l^{-1} BA içeren kültür

ortamına 0.25-4 mg^l⁻¹ GA₃ ya da GA₄₊₇ nin eklenmesiyle sürgün proliferasyonu ve büyümenin oluşmadığı da aynı çalışmada rapor edilmiştir (Barghchi ve Alderson 1983a).

Başka bir çalışmada Bustamante-Garcia'ya göre BA için optimal değer *P. atlantica*'da ise 1 mg^l⁻¹ dir. Aynı araştırmacılar alt kültür için optimum şartlarda sürgün üretiminin, iki haftada bir BA+GA₃+IBA ile desteklenmiş besi ortamına taze uçların orjinal nodlarıyla birlikte transfer edilmesiyle başarılabileceğini bildirmişlerdir (Bustamante-Garcia, 1984).

Abousalim (1990) BA'nın optimal seviyelerinin sürekli kullanımının çok küçük yapraklı bodur sürgünler ürettiğini ve bu tip materyallerin alt kültürleri esnasında arzu edilmeyen sonuçların ortaya çıktığını bildirmiştir. (Abousalim 1990).

Onay (2000b); maternal ağaçlardan elde edilen aksenik sürgünlerin proliferasyonu sonrası, yapılan alt kültürlerde, daha önceki çalışmalarında tespit ettiği optimum BA oranında,(2-4 mg^l⁻¹) bir değişimin olup olmadığını belirlemek için yaptığı bir başka çalışmada, kullanılacak optimum BA oranını 1.0-2.0 mg^l⁻¹ olarak rapor etmiştir.

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

Çalışmamızda ise; daha önce kültür başlatılması için tespit ettiğimiz optimum BA oranının (1.0 mg^l⁻¹), sürgün proliferasyonunu izleyen alt kültürlerde (0.25-2 mg^l⁻¹) arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 18). Bu farklılığın nedeninin kültüre alınan sürgün uçlarının kültüre alındığı dönemin ve dolayısıyla rejenerasyon potansiyellerinin değişik olmasından kaynaklandığı kanısındayız.

5.4. Köklendirme Çalışmaları ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Antepfistiğinin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında kullanılan sürgün uçları, genellikle 1.5-2 cm boyuna ulaşmış, 2-4 yaşına kadar yetiştirilmiş bitki kökenli sürgün uçlarıdır (Barghchi ve Alderson 1983b; Pontikis 1984; Abousalim 1990, Onay 1996).

Ancak çalışmamızda ise *in vitro* köklenme için 25 yaşında olgun erkek Antepfistiği ağaçlarından alınan tomucuklardan prolifer ettiğimiz 4 cm uzunluğundaki sürgün uçları kullanılmıştır.

Barghchi ve Alderson (1983b) yaptıkları araştırmada *in vitro* köklendirme için en uygun oksinin IBA olduğunu tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada Barghchi köklendirmenin 1/2 konsantrasyonda makro besin elementleri kullanılarak hazırlanan besi ortamına alınan eksplantların kültürünün ilk 7 günü karanlık şartlar altında inkübasyona bırakılmasıyla ve sonunda 1-2 mm uzunluğa ulaşan köklerin oksinsiz ortama aktarılmasıyla gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

Barghchi ve Alderson iki yaşına kadar olan *P. vera*'dan alınan eksplantlardan alınan sürgünlerin köklendirilmesinde 2.5, 3.0 ya da 3.5 mg^l⁻¹ IBA'nın kullanılmasında önemli bir farklılık olmadığını ve her üç oranda da köklenmenin yaklaşık olarak % 80 olduğunu gözlemlemişlerdir (Barghchi ve Alderson 1985).

Bununla birlikte, optimum köklenme yanıtları ortama yaklaşık olarak 1 mg^l⁻¹ ve 2 mg^l⁻¹ oranlarında IBA eklendiğinde ve köklenme için alt kültürü yapılmış eksplantlar kullanıldığında alınmış olduğu Abousalim (1990) tarafından bildirilmiştir. Bustamante-Garcia 1984'te yaptıkları bir çalışmada orjinal eksplantların köklenmesinin sıvı ya da katı NAA ve IBA ile artırıldığını bildirmişlerdir (Bustamante-Garcia 1984). Ancak en iyi yanıtın kağıt filtre köprüleri ve NAA ile desteklenen sıvı ortam kullanıldığında elde edildiğini bildirilmiştir.

Pontikis eksplantların olgun *P. terenbinthus*'tan alındığında (%60) (Pontikis 1984) ve Martinelli dört yaşına kadar büyümüş *P. vera*'lardan alındığında (%30-40) (Martinelli 1988) daha zayıf bir köklenmenin olduğunu açıklamışlardır. Ancak buna karşın 100 mg^l⁻¹ IBA içine 10 sn batırılan mikro

sürgün ve sürgün uçlarında optimum köklenmenin % 50 olduğu aynı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Tilkat ve ark. (2005), Antepfıstığının diğer bir anacı olan *Pistacia khinjuk* Stocks'un olgun tohumlarından *in vitro* geliştirdiği 2-3 cm boyundaki aksenik apikal sürgün uçlarının köklendirilmesi çalışmalarında optimum sonucun % 100 köklenme oranı ile, 0.5 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan alındığını rapor etmiştir.

Onay (2000a) meyve veren 30 yıllık Antepfıstığı ağaçlarından 3-4 cm uzunluğunda aldığı ligninleşmiş terminal gövde kısımlarını ilk olarak 10 mg^l⁻¹ BA ve 10 mg^l⁻¹ IBA ile bir ön işleme tabi tutarak yeni sürgün vermeye zorlamış, ve daha sonra *in vivo* gelişen lateral segmentleri *in vitro* çoğaltma çalışmalarında eksplant olarak kullanmıştır. Aynı araştırmacı bu eksplantlardan *in vitro* çoğaltılan sürgün uçlarının köklendirilmesi çalışmalarında en iyi sonucun 2.0 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamından alındığını rapor etmiştir.

Onay ve arkadaşları (2003) olgun Antepfıstığı (*Pistacia vera* var. "Siirt") ağaçlarının *in vitro* mikroaşılınması konulu çalışmalarında *in vitro* mikroaşılı fidelerin 0,5 mg^l⁻¹ IBA destekli MS köklendirme ortamında % 36 oranında başarı ile gelişimlerini sürdürdüklerini ve % 28.5 oranında da yeni aksiler sürgün oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Dolcet-Sanjuan ve Claveria (1995), anaç olarak 3 yaşındaki *P. paleastina* ile aşılınmış sürgün uçlarının mikroçoğaltımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, 1-3 cm uzunluğunda sürgünlerin köklendirilmeleri aşamasında 6.0 mg^l⁻¹ NAA içeren köklenme ortamında sürgünlerin % 62'sinde kök oluşumunun gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar aynı zamanda köklenme için ilk hafta köklenme ortamında tutulan sürgünlerin, ilk haftadan sonra iki hafta boyunca oksin içermeyen besi ortamına alınmasının tabanda oluşan kallustan kök oluşumunu teşvik ettiğini ve ayrıca *Pistacia vera* sürgün kültürlerinde Barghchi ve Alderson (1989), Martinelli (1988), Mederos ve Cerreno (1991) ve Parfitt ve Almehdi (1994)'nin çalışmalarında rapor ettiklerinin aksine köklenme için kullanılabilir en iyi oksin çeşidinin IBA yerine NAA olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ise Dolcet-Sanjuan ve Claveria (1995)'nin bulgularının aksine ve Barghchi ve Alderson (1989), Martinelli (1988), Parfitt ve Almehdi

(1994), Onay (2000) ve Onay ve ark. (2003)'ün çalışmaları sonucunda rapor ettikleri bilgilere paralel olarak olgun Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında test edilen tüm oksin tipleri (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D) içinde en uygun oksinin IBA olduğu (Tablo 29) ve IBA'nın test edilen farklı konsantrasyonları arasında da en iyi sonucu % 65 kök oluşturma oranıyla 2.0 mg^l⁻¹ IBA destekli MS besi ortamının verdiği tespit edilmiştir (Tablo 30). Çalışmamızda köklenme oranı daha sonra, 4 cm boyunda eksplantlar kullanılacak % 73'e çıkarılmıştır (Tablo 31).

5.5. Aklimatizasyon ve Tarla Koşullarına Aktarma ile İlgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Barghchi ve Alderson (1985) *in vitro* köklendirilen bitkiciklerin toprak-turba karışımına (%70-80) başarıyla aktarılıp yaşatıldığını ve adaptasyon için her eksplantın bir köke sahip olmasının yeterli olduğu bildirilmiştir (Barghchi ve Alderson 1985). Bununla birlikte *P. vera* bitkiciklerinin köklendirilmesi konusunun araştırıldığı diğer deneylerde besi ortamından ayrılan bitkiciklerin sera şartlarına aktarıldıktan sonra büyümedikleri ve öldükleri Martinelli (1988) tarafından bildirilmiştir. Abousalim (1990) ise *P. vera* fidelerinden alınan sürgünlerin *in vitro* olarak köklendirilmesinin ardından aklimatizasyonun % 81.8 oranında başarıyla gerçekleştiğini rapor etmiştir (Abousalim 1990).

Dolcet-Sanjuan ve Claveria (1995), ise 0,2 mg^l⁻¹ MeJA (Methyl Jasmonate) ve 6.0 mg^l⁻¹ NAA içeren ortamda köklendirilen sürgünlerin, hem daha fazla kök oluşturduğu hem de daha kısa kök oluşturarak kırılmalara karşı daha dayanıklı olduklarını rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, elde ettikleri bu kısa ve çok sayıda köke sahip rejenerantların toprağa aktarıldıktan sonra % 73'ünün yaşamlarını devam ettirdiğini bildirmişlerdir.

Parfitt ve Almehdi (1994), 1-3 yaşındaki *P. integerrima* ve *P. atlantica* hibriti olan UCB-1 için 2,5 mg^l⁻¹ IBA içeren besi ortamında köklenme oranının % 88 olduğunu ve aklimatizasyonun ardından doğal şartlarda başarı ile yaşatılan bitki oranının % 100 olduğunu bildirmişlerdir.

Tilkat ve ark. (2005), *Pistacia vera*'nın anaçlarından biri olan *Pistacia khinjuk* Stocks'un *in vitro* klonal çoğaltılması sonrası gerçekleştirdikleri aklimatizasyon çalışmalarında köklendirdikleri sürgünlerin tam steril torf

içerisinde 1-2 hafta kademeli olarak nemlilik oranını azaltarak ve ikinci yada üçüncü haftanın sonunda steril olmayan 1:1:1 torf : kum : toprak karışımına % 100 başarı ile transfer edildiğini rapor etmişlerdir (Tilkat ve ark., 2005).

Onay (1996) *P. vera* fidelerinden alınan sürgünlerin *in vitro* olarak köklendirilmesinin ardından aklimatizasyonun % 80 oranında başarıyla gerçekleştiğini ancak 1 yıl sonra yaşayan bitki oranının % 50'den az olarak gerçekleştiğini rapor etmiştir.

Yine aynı araştırmacı *in vitro* koşullarda mikroaşılı 3 haftalık fidelerin tam steril torf ve daha sonra torf : kum : toprak karışımı ile % 100 oranında doğal şartlara alıştırdığını rapor etmiştir (Onay, 2003).

Çalışmamızda ise apikal tomurcuk kökenli, köklendirilmiş erkek Antepfıstığı rejenerantları, 21 günlük kademeli aklimatizasyon süresi sonunda, 1:1:1 oranlarındaki tam steril torf : kum : toprak karışımına % 90 oranında başarı ile transfer edilmiş ve iki ay sonra toprağa aktarılan rejenerantların % 95'i nin büyümeye devam ettikleri rapor edilmiştir.

6. İLERİYE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Bu çalışma ile ilk kez olgun erkek Antepfıstığı ağaçlarının apikal tomurcuklarından organojenez yoluyla mikroçoğaltımı için rutin olarak kullanılabilir bir *in vitro* çoğaltma metodu tanımlanmıştır.

Ancak bu çoğaltma protokolünün ticari kullanımı için aşağıdaki hususlar dikkate alınmalıdır:

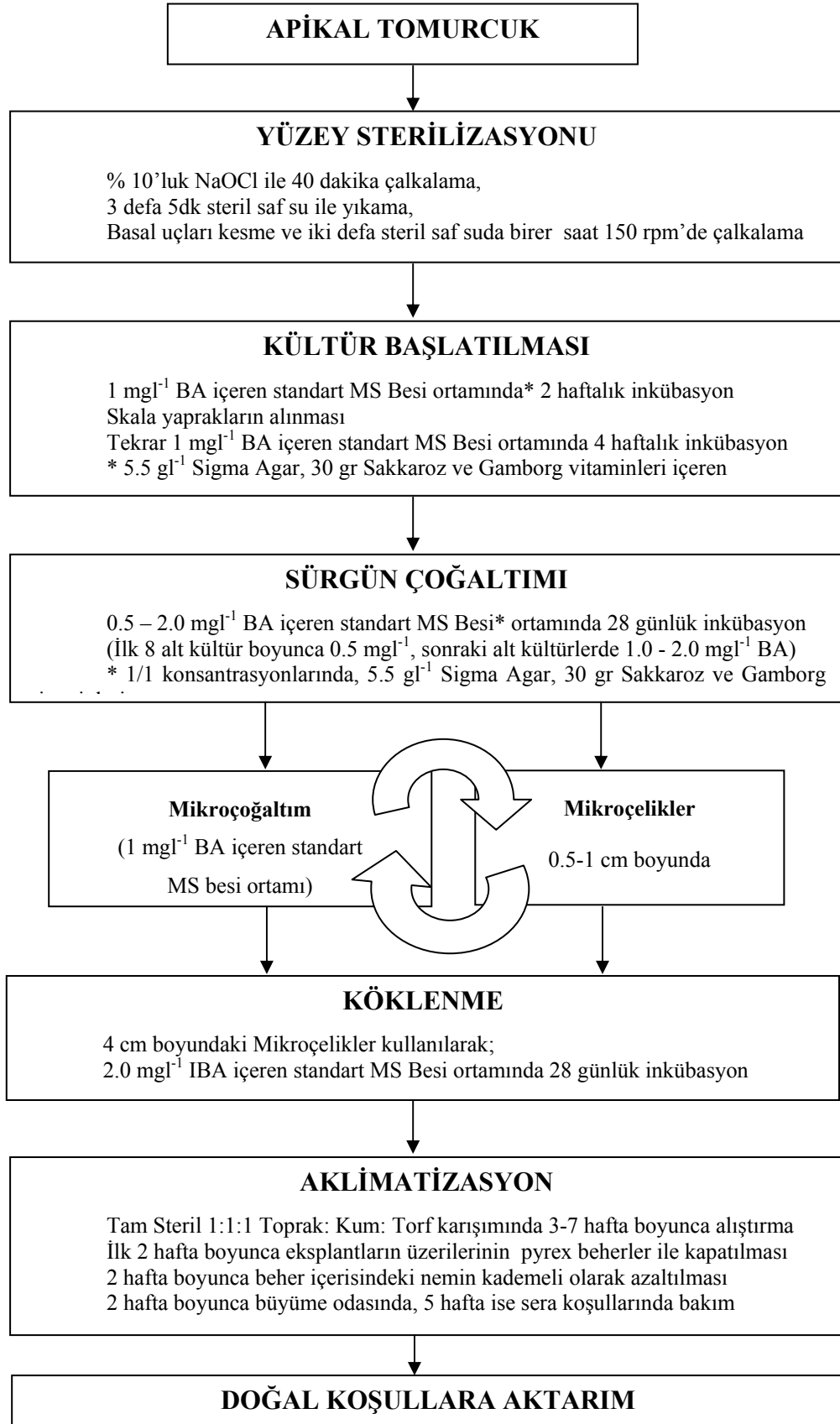
1. Metodun yoğun çoğaltım için kullanılmadan önce uygulayıcı kuruluş tarafından her aşamasında tekrar edilebilirliği test edilmelidir.
2. Geliştirilen yüzey sterilizasyonu tekniği çoğaltmada kullanılacak eksplantların sadece yüzey patojenlerini (bakteri, küf, mantar, vb.) uzaklaştıracağı için yoğun çoğaltıma geçilmeden önce, çoğaltım için kullanılacak eksplantlarda endojen mikroorganizma olup olmadığı test edilmelidir (Virüs indeksleme testleri; Elisa testi vb.).
3. 1982’de Barghchi ile başlayan Antepfıstığının *in vitro* mikroçoğaltılması çalışmaları incelendiğinde; olgun ağaçlardan alınan eksplantlardan kültür başlatılmasında enfeksiyon ile eşdeğer olarak sorun yaratan fenolik bileşiklerin kültür ortamına salınması problemi ilk olarak çalışmamızda tam anlamıyla bertaraf edilmiştir.
4. Kültür başlatılması çalışmalarında, kültüre alınacak eksplantlar, Onay 2000’de rapor edildiği gibi ya *in vivo* olarak, yada bu çalışmada rapor edildiği gibi *in vitro* olarak sürgün gelişimine zorlanması gereklidir.
5. Her ne kadar % 73’lük köklenme oranı elde edilmişse de bu oranın, aşağıdaki çalışmalar yapılarak % 100’e çıkarılabileceği kanısındayız:
 - a. Çalışmamızda elde ettiğimiz çeliklerde köklenmeye karanlığın etkisi tespit edilmemişse de ışık/karanlık fotoperiyot oranının köklenmeye etkisi yeniden test edilmesi,
 - b. Tıpkı kültür başlatılmasında olduğu gibi, köklenme için de kültüre alınacak mikroçeliklerin bazal uçlarından salınan fenolik bileşikler yıkama ile bertaraf edilmeli ve yoğun hormon konsantrasyonuna daldırılması,

- c. Köklenme için kültüre alınan çeliklerin radikulanın belirmesinden sonra daha düşük konsantrasyonlu ya da hormon içermeyen besi ortamına alınması denenmelidir.
6. Bitkinin doğal biyolojik yapısından *in vitro* üretilen fidelerin tarla koşullarında gelişmesi ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Yoğun üretime geçmeden önce *in vitro* üretilen fidelerin tarla performansı mutlaka test edilmeli, ayrıca tarla koşullarında gelişen bitkilerin genetik fideliteleri kontrol edilmelidir.

Çalışmamızda seçkin erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının apikal uçlarından itibaren organogenezisle çoğaltılması için geliştirilen metodun ana hatları ve optimum koşulları Diyagram 1.'de verilmiştir.

Sonuç olarak recalcitrant bir bitki türü olan Antepfıstığının *in vitro* mikroçoğaltılması için farklı laboratuvarlarda birçok araştırmacı tarafından çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Ancak Antepfıstığının *in vitro* klonal çoğaltımı için öncelikle yeniden test edilmiş bir entegre mikroçoğaltım metodu ve metodun geliştirilmesi için bir araştıma merkezinin kurulması gereklidir.

Köklenmesi zor ve odunsu bir bitki olan erkek Antepfıstığı üzerine yapılan bu çalışmanın sonuçları diğer odunsu bitkilere de uygulanabilir ve yukarıda belirtilen ileriye yönelik çalışmaların moleküler tekniklerle desteklenerek yapılmasıyla Antepfıstığı gibi odunsu bitkilerin bazı kompleks mekanizmalarının aydınlatılmasını mümkün kılabilir. Bu çalışmada tanımlanan *in vitro* mikroçoğaltma metodunun gelecekte Antepfıstığı endüstrisinin gelişmesine faydalı olacağını ümit ediyoruz.



Diyagram 1. Erkek Antepfıstığı *Pistacia vera* L. sürgün uçlarından *in vitro* bitki üretim tekniğinin ana hatları ve optimum koşulları

7. REFERANSLAR

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

AK B.E., KAŞKA N. ve AÇAR Ş. (1999). Dünyada ve GAP Bölgesinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Üretimi, Yetiştirme ve İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması. GAP I.Tarım Kongresi 26-28 Mayıs 1999, Şanlıurfa.

AK, B.E., (2001). Fıstık Bahçelerinde Tozlanma ve Erkek Ağaçların Önemi. Tarım Bülteni, T.C. Başbakanlık GAP Kalkınma İdaresi Bölge Müdürlüğü ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şanlıurfa Tarım İl Müdürlüğü Tarım Bülteni, 5(26): 12-13.

AKKÖK, F. ve KARACA R. (1993) Uzun, Siirt ve Ohadi Antepfıstığı çeşitlerinin entansif şartlarda gelişme, verimi kalite ve rantabilitelerinin incelenmesi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yıllık çalışma Raporları, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü yayınları, 18-23.

AL BARAZI Z AND SCHWABA W.W. (1982) Rooting softwood cutting of adult *Pistacia vera*. *Journal of Horticultural Sciences* 57, 247-252.

ANONİM (2002) Dana Bauer, <http://www.rps.psu.edu/0201/pistachio.html>

ANONİM (2003) http://www.sahravi.com/articles2_dates-raisins-pistachio.htm

ANONİM (2003a) <http://economics.ca/2003/papers/0460.pdf> Global Pistachio Production and Marketing Challenges

ANONİM (2003b) USDA Nutrient Database for Standard Reference <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR17/wtrank/sr17w301.pdf>

ANONİM (2004) USDA Nutrient Database for Standard Reference International Nut and Dried Fruit Council <http://www.treenuts.org/index.php?op=7&fam=235&id=41>

ANONİM (2006a) <http://www.gap.gov.tr/Turkish/Ggbilgi/gbilesen.html> GAP'ın Bileşenleri, GAP'ta Ulaşılan Son Nokta.

ANONİM (2006b) <http://www.vegparadise.com/highestperch35.html>

ANONİM (2006c) Sağlık Sayfam, Sağlıklı Yaşam için Bilgiler, Antepfıstığı <http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/antepfistigi.html>

ARPACI, S., KARADAĞ S., YÜKÇEKEN Y., TAHTACI S. (1999) Antepfıstığında Tüplü Fidan Üretiminin Geliştirilmesi, 29 s. (Sonuç raporu), Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Gaziantep.

ATLI, H.S, (1992) Antepfıstığı Semineri 31 Ağustos – 4 Eylül 1992, Gaziantep, 49-58.

ATLI, H.S, KASKA N. and ETİ S. (1994), Önemli Antepfıstığı Çeşitleri İçin Gaziantep ve Çevresindeki Erkek Tiplerin Seçilmesi. First International Symposium on Pistachio Nut, Adana-Turkey.

ATLI H. S. ve KAŞKA N. (2003), Önemli Antepfıstığı Çeşitleri İçin Gaziantep ve Çevresindeki Erkek Tiplerin Seçilmesi, 38 s. (Sonuç raporu), Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Gaziantep.

AYFER, M. (1959). Antepfıstığının Döllenme Biyolojisi üzerine Araştırmalar. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 148, No: 93, 1-104.

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

AYFER, M. (1963) Pistachio nut and its problems with special reference to Turkey. University of Ankara, *Faculty of Agriculture Yearbook*, pp. 189-217.

AYFER, M. (1990) Antepfıstığının Dünü Bugünü Geleceği. *Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu Bildirileri*, 11-12 Eylül 1990- Gaziantep, pp. 14-23.

AYFER, M., OKAY, Y. AND ERDOĞAN, V. (1990) Antepfıstığı Anaçları ve Çoğaltılmaları. *Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu Bildirileri*, 11-12 Eylül 1990- Gaziantep, pp. 38-48.

BABAOĞLU, S., YORGANCIOĞLU, M., AKBUDAK, M.A. (2002) Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri: Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları (Edt. Babaoğlu S., Gürel E., Özcan S.) Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya,32

BARGHCHI, M. (1982) *In vitro* propagation of *Pistacia* species. PhD Thesis, Nottingham University, UK.

BARGHCHI, M. AND ALDERSON, P.G. (1983a) *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. *Journal of Horticultural Science* **58**, 435-445.

BARGHCHI, M. AND ALDERSON, P.G. (1983b) *In vitro* propagation of *Pistacia* species. *Acta Horticulturae* **131**, 49-60.

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

BARGHCHI, M. AND ALDERSON, P.G. (1985) *In vitro* propagation of *P. vera* L. and commercial varieties of Ohadi and Kelleghochi. *Journal of Horticultural Science* **60**. 423-440.

- BARGHCHI, M. (1985)** *In vitro* culture of mature commercial varieties of *Pistacia vera* L. *Proceeding of International Plant Propagators Society* 35. 331-333.
- BARGHCHI, M. (1986a)** *In vitro* micropropagation of *Pistacia* rootstocks. *Proceeding of the International Plant Propagators Society* 35. 334-337.
- BARGHCHI, M. (1986b)** Control of *in vitro* shoot tip necrosis in Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Plant Physiology Division Biennial Report. Palmerston North Department of Scientific and Industrial Research (D.S.I.R.), p.52.
- BARGHCHI, M. AND ALDERSON, P.G. (1989)** Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 5. Trees II, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 68-98.
- BENDER, B. (1975)** *Farming in prehistory: from hunter gatherer to food-producer*. John Baker Publishers, London.
- BILGEN, A. M., (1973)** Antepfıstığı, Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Basın Yayın ve Halkla İlişkiler Dairesi Başkanlığı Yayınları.
- BILGEN, A. M., (2001)** Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Antep fıstığı yetiştiriciliği kitabı syf 37, 2001.
- BROTHWELL, D. AND BROTHWELL, P. (1969)** *Food in antiquity: a survey of the diet of early peoples*. Frederik A. Praeger Publ., New York.
- BROWN D.C.W. AND THORPE T.A. (1995)** Crop improvement through tissue culture. *World J. Microb. Biotech.*, 11: 409-415.
- BUSTAMANTE-GARCIA, M.A. (1984)** Micropropagation and Rejuvenation of *Pistacia* species and the mechanism by which light influences root initiation. PhD Thesis, University of California, Davis, USA.
- CRANE J.C., (1937)** Pollination Control in Nut Breeding. *Ann. Rep. Nort Nut Grow. Assoc.*, 28: 105-109.
- CRANE J.C., (1974)** Hermaphroditism in *Pistacia*. *Calif. Agr.*, 28(2): 3-4.
- CRANE J.C. AND FORDE H.I., (1974)**; Improved pistachio seed germination. *Cal. Agr.* 28 (9): 8-9.
- CRANE J.C. (1978)** Quality of pistachio nuts as affected by time of harvest. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 103. 332-333.
- CRANE J.C. AND IWAKIRI B.T, (1980)** xenia and metaxenia in pistachio *Hort. Sci.*, 15(2): 184-185.
- CRANE J.C. AND IWAKIRI B.T, (1981)** Morphology and Reproduction of Pistachio. *Horticultural Reviews* 13. 376-393.

- CRANE J.C. (1984)** Pistachio Production Problems. *Fruit Varieties Journal* 38 (3): 74-85.
- CRANE J.C. AND MARANTO J., (1989)** Pistachio Production. Univ. of California. Publication No: 2279, 15 s.
- DE CONTESON, H. (1983)** Early agriculture in western Asia. *Studies in ancient oriental civilization* 36. 57-74.
- DOLLO, L., HORMAZA J.I., AND POLITO V.S. (1995)** RAPD Polymorphism among Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Fruit Varieties Journal* 49 (3): 147-152.
- DUKE, JAMES A. (1989)** *CRC Handbook of Nuts*. CRC Press. pp. 240-243.
- DOLCET SANJUAN, R. AND CLAVERIA, E. (1995)** Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia vera* L. and the beneficial-effects of methyl jasmonate. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120. 938-942.
- FERGUSON, L. AND ARPAIA M. (1990)** *New subtropical tree crops in California*. p. 331-337. In: J. Janick and J.E. Simon (Eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR.
- GONZALES, A. AND FRUTOS, D. (1990)** *In vitro* culture of *Pistacia vera* L. embryos and aged tree explants. NATO ASI series A. 186. 335-338.
- HALL, J. (1975)** Propagation of walnuts, almonds and Pistachios in California. *Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 25. 53-57.
- HANSMAN, D. AND OWENS Y DE NOVOA, C. (1986)** Micropropagation of temperate nut trees. *Horticultural Abstracts* No 6, pp. 403-416.
- HARTMAN, H.T. AND KESTER, D.E. (1983)** *Plant propagation, Principles and Practices*. 4th edition. Prentice-Hall International, Inc., London.
- JOLEY, L.E. AND OPITZ, K.W. (1971)** Further experiments with propagation of *Pistacia*. *Proceedings of the International Plant Propagators Society* 21. 67-76.
- JOLEY, L.E. (1979)** Pistachios. In: Jaynes RA (Ed.) *Nut tree culture in North America*. The Northern Nut Growers Assoc. Hamden, Conn., pp. 163-174.
- JOLEY, L. E. (1953)** Sert Kabuklu Antepfıstığı. Tarım Bak., Zir. İşleri Genel Müdürlüğü Yayınları, D-154.
- JORET, C. (1976)** Les plantes dans l'antiquité au moyen age; histoire, usages et symbolisme. Slatkine Reprints, Geneve. Reprinted from the book first published in 1897-1904.
- KARIM KOSHTEH M.H. ve VARDAN E. URUTYAN (2003)** Global Pistachio Production And Marketing Challenges & Improvement strategy for agricultural marketing and development", *Iran Journal of trade study*, vol. 5 n. 23.

- KAŞKA N., ETİ S. ve AK B.E. (1989)** Antepfıstığında uçakla yapay tozlama üzerine bir tasarım. 2. Tarımsal Havacılık Sempozyumu Bildirileri. 11-13 Ocak 1989, 127-133.
- KAŞKA N., KÜDEN A.B. ve AK B.E. (1990)** Antepfıstıklarında soğuklama gereksinimleri üzerine çalışmalar. Türkiye 1. Antepfıstığı sempozyumu, 11-12 Eylül 1990, 261-267.
- KIRKBRIDE, D. (1966)** Beidha. An early neolithic village in Jordan. *Archaeology* 19. 199-207.
- KRAMER, C. (1982)** Village ethnoarchaeology; rural Iran in archaeological perspective. Academic Press, New York..
- KURU C., (1984)** Antepfıstığı Çiçeklerinin Yapay Yöntemlerle Tozlanması Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Gaziantep Ziraî Araştırma Enstitüsü yayınları: 1, 1-24
- KURU, C., UYGUR, N., TEKİN, H., KARACA, R., AKKÖK, F. VE HANCI, G. (1986)** Antep Fıstığı yetiştiriciliği ve Mücadelesi. Tarım Orman ve Köyişleri Bak. Proje ve Uyg. Gen. Müd. Gaziantep Ziraî Araş. Ens. Yay. No:2. syf 18-19.
- KURU, C., TEKİN H., KARACA R. (1990)** Yerli ve yabancı Antep fıstığı çeşitlerinin kalite özellikleri. *Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu Bildirileri*, 11-12 Eylül 1990- Gaziantep, pp. 25-30.
- KURU C., (1993)** Dikimden hasada Antepfıstığı Kitabı, Kahramanmaraş, Syf: 30-35.
- LEMAISTER J. (1959)** Le Pistacher (Etude bibliographique). *Fruits*, 14: 57-77
- MANSUROĞLU S. G., E. GÜREL, (2002)** Mikroçoğaltım, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları Kitabı-1 Editörler: Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin Özcan, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları s. 262-281.
- MARTINELLI, A. (1988)** Use of *in vitro* techniques for selection and cloning of different *Pistacia* species. *Acta Horticulture* 227. 436-437.
- MOLDENKE H N, ALMA L (1952)** Plants of Bible. *Chronica Botanica*.
- MOREL, G., (1960)** Production virus-free *Cymbidiums*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 29, 495-497. 1960.
- MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15. 473-497.
- NEVO, A., VERKER E. AND BEN-SASSON R. (1974)** The problem of Indehiscence of Pistachio (*Pistacia vera*) fruit. *Israel J. Bot.*, 23: 1-23
- ONAY A. (2003)** Micropropagation of pistachio. In: Micropropagation forest trees and fruits. Edited by S.Mohan Jain.
- ONAY A., İŞIKALAN Ç., ADIYAMAN F. (2003)** Micropropagation of pistachio. In: Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Edited by R.E. Litz.

- ONAY A., PIRINÇ V., TILKAT E., AKTURK Z., YILDIRIM H., (2004)** Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers, *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* (2004) 79 (6) 960-964.
- ONAY, A, JEFFREE, C.E. AND YEOMAN, M.M. (1995)** Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L. *Plant Cell Reports* 15. 192-195.
- ONAY, A. (1996)** *In vitro* organogenesis and embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. PhD Thesis, University of Edinburgh, UK.
- ONAY A. (1999)** Somatic Embryogenesis From Mature Seed Cultures of *Pistacia atlantica*. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. Vol. 24: 465-473.
- ONAY, A. (2000a)** Micropropagation of Pistachio from mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60. 159-162.
- ONAY, A. (2000b)** Somatic embryogenesis in cultured kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L. cv Siirt. Proceedings of the 2nd Balkan Botanical Congress. Volume II, Istanbul, pp.109-115.
- ONAY, A. (2000c)** Histology of somatic embryo initiation and development in Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turkish Journal of Botany* 24. 91-95.
- ONAY, A. AND JEFFREE, C.E. (2000)** Somatic Embryogenesis in Pistachio. In: *Somatic embryogenesis in woody plants* / edited by S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, Ronald J. Newton (Forestry Sciences). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Chapter 10, Section B, Vol: 6. pp. 361-390.
- OPITZ, K.W. (1975)** The pistachio nut. Univ. of California Leaflet 2279, 6s.
- ÖZBEK, S. ve AYFER M. (1957)** *Pistacia* Türleri Üzerinde Sitolojik Araştırmalar. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yıllığı Fas. 3: 203-222.
- ÖZBEK, S., 1978.** Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 128, Ders Kitabı: 11, Ankara Üniversitesi Basımevi, 486 s. Ankara.
- PARFITT, D.E. AND ALMEHDI, A. (1994)** Use of high CO₂ atmosphere and medium modifications for the successful micropropagation of Pistachio. *Scientia Horticulturae* 56. 321-329.
- POLAT R., ÜLGER P., SAŞLAM R. ve SAŞLAM C. (2004)** A survey on the determination of statues of mechanization of pistachio farming and its problems in Turkey. Web site: <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c56/01600193.pdf>
- POLITO V.S., AND LUZA J.G. (1988)** Longevity of pistachio pollen determined by *in vitro* germination. J. American Soc. Hort. Sci., 113 (2): 214-217.
- POLITO, V.S. and LUZA, J.G. (1989)** Blanking in "Kerman" pistachio. California Pistachio Industry. Annual Repport Crop Year 1988-89, 81-83.

- PONTIKIS, C.A., (1984)** *In vitro* propagation of *Pistacia terebinthus* L. The Plant propagator 30 (3): 14-15.
- PONTIKIS, C.A. (1989)** Effects of Hydrojen cyanamide on bloom advancement in female pistachio (*Pistacia vera* L.) Fruit Varieties Journal 43 (3): 125-128.
- PORLINGIS, I.C. AND D.G. VOYIATZIS (1986)** Flower synchronization of staminate and pistillate pistachio trees (*Pistacia vera* L.) with paclobutrazol. Acta Hort. Growth Regulators 179: 521-527.
- PROCOPIOU, J. (1973)** The induction of earlier blooming in female pistachio trees by mineral oil-DNOC winter sprays. J. Hort. Sci., 48:393-395.
- TEKİN H., ARPACI S., ATLI S., AÇAR İ. KARADAĞ, S., YÜKÇEKEN Y., YAMAN A. (2001)** Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Antep fıstığı yetiştiriciliği kitabı syf 9-38.
- TILKAT, E., (2003)** *P. khinjuk* Stocks'un *in vitro* Mikroçoğaltılması, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s.77.
- TILKAT, E., IŞIKALAN, Ç., ONAY, A., (2005)** *In vitro* Propagation of Khinjuk Pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture, Propagation of Ornamental Plants, Vol. 5, No: 3, 2005: 1-5
- ULUSARAÇ A., (1992)** Mevcut standart Antepfıstıklarına Anaç Seçimi. III. Arasonuç raporu (Basılmamış), Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep.
- VAVILOV V.L. (1951)** The origin, variation, immunity and cultivated plants. Tr. from Russian by K.S. Chester. Chronica Botanica. Nr. I/6.
- WHITEHOUSE W.E. (1957)** The pistachio nut-A new crop for the Western United States. Econ Bot, pp: 281-321.
- WOODROOF, J.G. (1979)** Tree nuts, Production, Processing, Products. Vol. II, 2nd Edit. AVI, West Port Connecticut.
- YALPANI, M. AND TYMAN J.H.P (1983)** Phenolic Acids of *Pistacia vera*, Phytochemistry Volume: 22, No: 10, pp: 2263-2266.
- ZOHARY, M. (1952)** A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestianian Journal of Botany* (Jerusalem) 5. 187- 228.

8. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Türkiye’de Antepfıstığı Ağaç Sayısı ve Üretimi (ton) ve Ürün Drumu	22
Tablo 2. Dünya Fıstık Üretiminin Yıllara ve Ülkelere Göre Dağılımı.....	24
Tablo 3. Antepfıstığı Yetiştiriciliği Yapılan Alan Miktarları.....	25
Tablo 4. Antepfıstığı, Fındık, Ceviz ve Sığır Eti Besin Değerleri.....	28
Tablo 5. Antepfıstığı’nın 100 gr’nın İçerdiği Besin Değerleri.....	28
Tablo 6. Antepfıstığı’nın 100 gr’nın İçerdiği Mineral Madde, Vitamin ve Yağ Asidi Değerleri.....	29
Tablo 7. Fıstık türlerinin ve anaçlarının <i>in vitro</i> çoğaltılması.....	38
Tablo 8. Standart Murashige ve Skoog Besi Ortam İçeriği ($g\ l^{-1}$).....	54
Tablo 9. NaOCl’nin değişik konsantrasyonlarının, 25 yıllık Antepfıstığı erkek ağaçlarından alınan eksplantlarının yüzey sterilizasyonu üzerine etkisi.....	71
Tablo 10. Farklı immersiyon sürelerinin 25 yıllık Antepfıstığı erkek ağaçlarından alınan eksplantlarının yüzey sterilizasyonu üzerine etkisi.....	72
Tablo 11. Farklı kimyasal uygulamaların fenolik bileşiklerin adsorbe edilmesine etkisi	73
Tablo 12. Fenolik bileşiklerin salınmasının engellenmesine H_2O_2 ve steril saf suda yıkamanın etkisi.....	75
Tablo 13. Kültür başlatılmasına eksplant tipinin etkisi.....	76
Tablo 14. Kültür Başlatılmasına Sitokininlerin (BA, Kin) Etkisi.....	78
Tablo 15. BA’nın farklı konsantrasyonlarının kültür başlatılmasına etkisi.....	79
Tablo 16. Regenerasyon potansiyeline kültüre alınma zamanının etkisi.....	81
Tablo 17. Sürgün Proliferasyonuna Sitokininlerin (BA, Kin, TDZ) Etkisi.....	82
Tablo 18. Sürgün Proliferasyonuna Alt Kültürlerin Etkisi.....	83
Tablo 19. Sürgün Proliferasyonuna BA’nın farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	85
Tablo 20. <i>P. vera</i> L.’nin sürgün proliferasyonu için kullanılan kültür ortamının mineral bileşenleri ($mg\ l^{-1}$).....	86
Tablo 21. Sürgün Proliferasyonuna Besi ortam Tipinin (MS, WPM, SH) Etkisi.....	86
Tablo 22. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna GA_3 ’in farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	87
Tablo 23. Sürgün Proliferasyonunda En İyi Sitokinin Konsantrasyonuna Oksin Tipinin Etkisi.....	88
Tablo 24. Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortam Konsantrasyonunun Etkisi.....	89
Tablo 25. Sürgün Proliferasyonuna Karbohidrat Çeşidinin (Sakkaroz, Glikoz, Maltoz ve Fruktoz) Etkisi.....	91

Tablo 26. Sürgün Proliferasyonuna En İyi Karbohidrat Çeşidinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	92
Tablo 27. Sürgün Proliferasyonuna Poliaminlerin (Spermine, Spermidine, Putrescine) Etkisi.....	93
Tablo 28. Bir Hafta Karanlık Uygulaması Yapılmış Sürgünlerin Köklenmelerine Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi.....	94
Tablo 29. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) Etkisi.....	95
Tablo 30. Sürgünlerin Köklenmeleri Üzerine En İyi Oksin Tipinin (IBA) Farklı Konsantrasyonlarının (0,5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 ve 8.0 mg ^l ⁻¹) Etkisi.....	96
Tablo 31. Köklenmeye Eksplant Uzunluğunun Etkisi.....	97
Tablo 32. Erkek Antepfıstığı rejenerantlarının aklimitasyonuna torfun etkisi.....	99

9. ŞEKİL LİSTESİ

Diyagram 1. Erkek Antepfıstığı <i>Pistacia vera</i> L. sürgün uçlarından <i>in vitro</i> bitki üretim tekniğinin ana hatları ve optimum koşulları.....	116
---	-----

10. RESİM LİSTESİ

<i>Resim.1. Apikal ve Lateral Tomurcuklar</i>	10
<i>Resim 2. Dişi Çiçek</i>	10
<i>Resim 3. Erkek Çiçek</i>	12
<i>Resim 4. Dişi çiçek salkımı</i>	13
<i>Resim 5. Antepfıstığı meyve salkımı</i>	17
<i>Resim 6. Çalışmamızda kullanılan eksplant tipleri, Apikal ve Lateral Tomurcuk</i>	51
<i>Resim 7. Besi Ortamına Salınan Fenolik Bileşikler</i>	74
<i>Resim 8. Kültüre alımdan 3 gün sonra apikal meristem uçları</i>	77
<i>Resim 9. İlk kez kültüre alınan apikal uçlarda kültüre alımdan yaklaşık 10 gün sonra yeni sürgün oluşumları</i>	80
<i>Resim 10. 1 mg^l BA destekli MS besi ortamında kültüre alınmış apikal sürgünler</i>	82
<i>Resim 11. 0.5 mg^l BA içeren MS besi ortamında kültüre alımdan 28 gün sonra prolifer olmuştur sürgünler</i>	84
<i>Resim 12. 2.0 mg^l IBA destekli MS besi ortamında köklendirilmiş sürgünler</i>	97
<i>Resim 13. Büyüme odasında tam steril 1:1:1 toprak:kum:torf karışımında aklimatizasyona tabi tutulan bitkiciklerin 14. günde görünüşleri</i>	100
<i>Resim 14. 5-6 haftalık aklimatizasyondan sonra doğal şartlara aktarılmaya hazır fideler</i>	100

11. ÖZGEÇMİŞ

17.01.1975 tarihinde Diyarbakır'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladıktan sonra 1994 yılında Dicle Üniversitesi Diyarbakır Meslek Yüksek Okulu Bilgisayar Programcılığı Bölümü'nü kazandım. 1996 yılında bu bölümden mezun oldum. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2000 yılında bu bölümden mezun oldum. 2000 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 04.06.2003'te "*Pistacia khinjuk* Stocks'un *in vitro* Mikroçoğaltılması" konulu yüksek lisans öğrenimimi tamamladım.

2003 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı'nda doktora öğrenimime başladım. 06.09.2006 tarihinde ise "Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L. cv. "Atlı") Ağaçlarının Mikroçoğaltılması" başlıklı doktora tezimi tamamladım.

Halen, Diyarbakır Merkez Kesikağaç Köyü İlköğretim Okulu'nda sınıf öğretmeni olarak görev yapmaktayım. Şu ana kadar araştırmacı olarak görev aldığım proje ve bildirilerin bazıları şunlardır:

YAYIN LİSTESİ

1. Onay A., **Tilkat E.**, Işıkalan Ç. and Namlı S., Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* cv. Siirt) In: Protocols for Micropropagation of Woody trees and Fruits. Editors: S. Mohan Jain and H. Häggman, Publisher: SPRINGER, The Netherlands., (2006) (*In press*)
2. **Tilkat, E.**, Işıkalan, Ç., Onay, A., *In vitro* Propagation of Khinjuk Pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture, Propagation of Ornamental Plants, Vol. 5, No: 3, 2005: 1-5
3. Onay A., Pirinç V., **Tilkat E.**, Aktürk Z., Yıldırım H., Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79 (6): 960-964, 2004
4. Onay A., Pirinç V., Işıkalan C., Adıyaman F., **Tilkat E.**, Başaran D., In vivo and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Cv."Siirt". Turkish Journal of Biology, 27: 95-100., 2003

KATILDIĞIM ULUSAL KONGRELER

2006. **Tilkat E.** and Onay A. Micropropagation of Male Pistachio (*Pistacia vera* L.), **XVIII. National Biology Congress**, June 26-30, Aydın (Kuşadası)-Turkey.
2006. Onay A. and **Tilkat E.** *In vitro* Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt), Turkish Scientific and Technical Research Society (TUBITAK) Participating Conference of Science, Technology and Novel Projects (23 June 2006)
2004. **Tilkat E.**, Onay A., Işıkalan Ç., Adıyaman F., Piriç V., *In vitro* Micropropagation of *Pistacia khinjuk* Stocks. **XVII. National Biology Congress**, June 21-24, Adana-Turkey.
2004. Yıldırım H., Onay A., Piriç V., Aktürk Z., **Tilkat E.**, *In vitro* Micropropagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L. var. 'Hacıhaliloğlu'). **XVII. National Biology Congress**, June 21-24, Adana-Turkey.
2004. Adıyaman A. F., Işıkalan Ç., **Tilkat E.**, Başaran D., Establishment of Micropropagation methods for Kiwi (*Actinidia deliciosa*) By Using Biotechnological Methods. **XVII. National Biology Congress**, June 21-24, Adana-Turkey.
2002. Onay A., Piriç V., Işıkalan Ç., Adıyaman F., **Tilkat E.**, Başaran D. *In vitro* and *In vivo* micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L. var 'Siirt') **XVI. National Biology Congress**, September 4-7, Malatya-Turkey.

KATILDIĞIM PROJELER

1. **TÜBİTAK** tarafından desteklenen "Antep fıstığının *in vitro* mikro aşılanması" konulu **TOGTAG-2815 No'lu proje** 15.08.2003'te **tamamlandı.**
2. **TÜBİTAK** tarafından desteklenen " Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Ağaçlarının Mikroçoğaltımı " konulu **TOGTAG-3355 No'lu proje devam ediyor.**

3. **DÜAPK** tarafından desteklenen “Yapay Mutasyon ve Biyoteknolojik Yöntemlerle Antepfıstığı'nın (*Pistacia vera* L.) Islahı” konulu **DUAPK 05-FF-61 No'lu proje devam ediyor.**
4. **DÜAPK** tarafından desteklenen “*Pistacia vera* L.'da Erkek ve Dişi Bireylerin Detaylı Karyotip Analizi” konulu **DUAPK 05-FF-62 No'lu proje devam ediyor.**