

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PISTACIA VERA L. (Antep fıstığı) MERİSTEMLERİNDEN İTİBAREN
IN VITRO ŞARTLARDA FİDAN ÜRETME YÖNTEMLERİ VE
AŞILANMAYLA OLUŞAN UYUMSUZ FERTLERİN ISLAHI ÇALIŞMALARI

(DOKTORA TEZİ)

SAİT YÜCEL

T.C. DICLE ÜNİVERSİTESİ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No	1991/412
Tadilat No	378-242
	583-28

581-166'7

491

1991

Diyarbakır - 1991

İÇİNDEKİLER:

	<u>Sayfa</u>
I-GİRİŞ.....	1
II-MATERYAL VE METOT.....	10
A-MATERYAL.....	10
B-METOT.....	11
1-İn vitro koşullarda meristemlerden komple bitkiler elde edilmesi	11
2-Aşı ile uyumsuzluk gösteren bazı antep fıstığı fidanlarının verimli hale getirilmesi.....	16
III-BULGULAR.....	17
A-İn vitro koşullarda meristemlerden itibaren komple bitkiler elde edilmesi.....	17
B-Aşıyla uyumsuzluk gösteren bazı antep fıstığı fidanlarının verimli hale getirilmesi.....	20
IV-TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
V- ÖZET.....	28
VI- SUMMARY.....	28
VII-KAYNAKÇA.....	30

I- GİRİŞ :

Bir hücreli organizmalar, başlı başına birer hücre olarak yaşamlarını sürdürdüklerinden beslenme, boşaltım, üreme gibi organların aynı hücrede toplandığı bilinmektedir. Halbuki çok hücreli organizmalarda değişik ödevler için farklılaşmış hücre ve dokular mevcuttur. Bu durum karşısında şöyle bir soru akla gelebilir: Çok hücreli bir organizmada farklı görevler için değişikliğe uğramış bir hücrenin ödevlerinin sınırlılık derecesi nedir?

İşte bu soruyu cevaplandırmak için çok hücreli bir canlıdan hücrelerin ayrılması ve bunların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereksinme duydukları bir besi ortamına yerleştirilmeleri gerekir. Böylece doku kültürleri düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Doku kültürleri düşüncesinin ortaya çıkışından (1) bugüne kadar, bitki doku kültürleri sayesinde, değişik bitkilerin organ ve hücrelerinin farklı beslenme ortamlarındaki invitro olarak kültüre alınmasıyla geliştirilen tekniklerle "Biyoteknoloji" alanında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Bitki doku kültürleriyle ilgili ilk çalışmalar HABERLANDT(1) ile başlamışsada başarılıbir sonuç elde edilememiştir. Bundan sonra BOBILIOF-PREISSER (2), KNUDSON (3), THIELMANN (4,5,6), CZECH (7), KUNKEL (8), KEMMER (9), PFEIFFER (10), GAUTHERET (11,12,13) Gibi birçok araştırmacılar da aynı çalışmalarını ye

niden ele almışlarsa da HABERLANDT'tan (1) daha başarılı olamamışlardır. Fakat bu şekilde doku kültürleri mefhumu ortaya çıkmıştır.

GAUTHERET (14) bazı havuç doku kolonilerine ait hücrelerin IAA etkisiyle ayrıştıklarını ve yine bunlardan bir kısmının bölünme yeteneğinde olduklarını kaydetmiştir. MOREL (15) *vitis* (üzüm) crown-gall doku kültürlerinden ayrılan müstakil hücrelerin püre görünümlü kolonilerini gözlemiştir. İlk kez MUIR ve ark. (16) izole edip kare şeklindeki bir filtre kağıdının üzerine yerleştirdikleri hücreleri bir besi dokusu üzerine koyarak hücre bölünmelerini ve bu şekilde oluşan toplulukların besi dokularından yoksun olan besi ortamlarında geliştiklerini göstermişlerdir. TORREY (17) ilk kez bir kültür parçası içeren sıvı bir besi ortamına yerleştirmiş müstakil bir bezelye hücrelerini mikroskop altında gözlemiştir. JONES ve ark. (18) ana dokudan ayrılmış tütün hücrelerini inceleme yoluna gitmişlerdir. Nihayet LUTZ (19) bir hafta önceden MURASHIGE ve SKOOG (20) çözeltisine konulan besi dokuları yardımıyla oluşturulan şartlandırılmış besi ortamlarına birbirinden ayrılmış hücreleri yerleştirerek % 70 randımanlı bölünmeler ve neticede bir hücre kökenli bir çok araştırmalar gerçekleştirmiştir.

LUTZ'ün(19) hücre izole etme yöntemlerini aynen uygulayan MOURAS (21) *Daucus carota* (havuç) suşlarında oluşturduğu embriyoların bir veya çok hücre kökenli olup olmadıklarını

araştırmıştır. Keza BAŞARAN (22), LUTZ 'ün (19) yöntemleriyle *Nicotiana tabacum L ,var - P 19* (tütün) kültürlerini inceleme sırasında tütün gövde parçalarını kültüre aldıktan 30 ay sonra ana suştan ayırdığı hücrelerden oluşturduğu bitkilerin normal olduklarını saptamış ve böylece ana suşlarda bulunan hücrelerin başlangıçtaki özelliklerini aynen koruduklarını veya sonradan normal tomurcuklar veren hücreler oluştuğunu ileri sürmüştür.

Her ne kadar bitki doku kültürleriyle ilgili çalışmalar bitki hücrelerinin kültüre alınmasıyla başlamışsa da başarılı in vitro araştırmalar organ kültürleriyle devam etmiştir. WHITE (23) *Nicotiana glauca x Nicotiana langsdorffii* (tütün) melezinin tümörlü dokularını sıvı besi ortamlarında kültüre olarak tomurcuklar elde etmiştir. Bunun ardından GAUTHERET (24) *Ulmus campestris* (karaağaç) kültürlerinden tomurcuklar elde etmiştir. Aynı şekilde SEGRETAIN (25) *Nicotiana* (tütün) gövde parçalarında benzer sonuçlar ortaya koymuştur.

Bu şekilde yapılan in vitro çalışmaların tam olarak istenen düzeye ulaşamamasının nedeni, bitkilerin gereksinim duyduğu komple bir besi ortamının keşfedilememesidir. Nitekim SKOOG (26) *Nicotiana* (tütün) türleri üzerinde çalışmalar yaparak, organ verme olaylarının kimyasal yolla kontrol altına alınma olanakları araştırmıştır. SKOOG VE TSUI (27) adeninin *Nicotiana* (tütün) doku kültürlerinde tomurcuk verimini artırdığını gözlemişlerdir. Bunun ardından JACQUIOT (28)

Ulmus campestris (karaağaç) dokularının kambiyum tabakasında tomurcuk elde etmede meso-inositol ve adedinin etkili olduğunu göstermiştir. Bilahare organ verimine etki eden bitkisel hormonlar araştırılmaya başlanmıştır. DAS ve ark. (29) *Nicotiana* (tütün) gövdelerinin öz bölgelerini oksin ve kinetin içeren besi ortamlarında kültüre aldıklarında, bölünmeler olduğunu gözlemişlerdir. Bu şekilde araştırmalar yoğunlaşırken SKOOG ve MILLER (30) oksin kinetin karışımının yalnızca hücre bölünmesinde etkili olmadığını, aynı zamanda organların oluşumuna ve bu hormonların birbirine göre farklı yoğunluklar şeklinde bir arada kullanılması, organlaşma durumunun gerek kök ve gerekse tomurcuk verme yönüne doğru kaydırılabileceğini de belirtmişlerdir.

Bütün bu gelişmelerden sonra WU (31), MURASHIGE VE SKOOG (20) çözeltilisinin makro ve mikro elemanlarıyla, 4 mg / L IAA ,2 mg /L Kinetin ,4 mg /L 2.4 -D ve % 10'luk Hindistan cevizi sütünü kullanarak embriyo oluşumunun son evresi olan *Camelia sinensis* kotiledonlarından itibaren tomurcuklanmanın ve neticede bunların gelişmesiyle komple bir çay bitkisini oluşturmuşlardır.

İn vitro çalışmalar 1958 'li yıllarda embriyo oluşturma yönüne kaydırılmıştır. GUHA ve MAHESHWARI (32) *Datura innoxia* 'nın (Boru çiçeği) erkek organlarını kültüre almak suretiyle androgenik embriyolar oluşturmuşlardır. HALPERIN ve WETHEL (33) oksinlerin, sitokininlerin ve azotun embriyo oluşumunda çok önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. BAŞARAN (34) ise *Nicotiana tabacum L. Cv. Siirt* (siirt tütünü) pistilerini değişik

sayıda anterle kültüre alarak yani anterlerdeki IAA'yı pistillere etki ettirerek, embriyo oluşumlarının değişik safhalarını gözlemiştir.

Kültür ortamında kullanılan hormonların önemini karşılaştırmak ve konsantrasyonlarını belirlemek için değişik çalışmalar yapılmıştır. Bunun için STUART ve ark (35) *Medicago* (yonca) embriyo kültürlerinde düşük konsantrasyonlarda 2.4-D kullandıklarında az sayıda somatik embriyo oluşturmalarına rağmen elde edilen embriyoların kalitesi ve çimlenme yüzdesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca LAZZERI ve ark. (36) NAA içeren ortamda ürettikleri soya fasulyesi embriyolarının 2.4-D içeren ortamda üretilenlerden daha iyi göründüklerini tespit etmişlerdir.

İn vitro ortamda bitkilerin değişik organlarından itibaren komple fertler üretilip, morfolojik özelliklerini incelemeye çalışan BAŞARAN ve ark. (37,38) 2.4-D, IAA ve Kinetin kullanılmak suretiyle *Nicotiana tabacum L. var "P 19"* (Tütün) gövde parçalarından geliştirdikleri bitkilerin morfolojik özelliklerini incelemişler ve ilk bu şekilde iki tip bitki elde etmişlerdir. Bunlardan normal görünenlerin steril, anormal bir morfolojik yapıda bulunanların ise %80 fertil olduklarını saptamışlardır. JOHRI ve SEHGAL (39) *Anethum graveolens* (Dere otu) bitkisinin ovulumundan itibaren in vitro embriyolar elde etmişlerdir.

In vitro kültür ortamında kullanılan bazı maddelerin önemine değinmek amacıyla yapılan çalışmalarda HAVRANEK ve VAGERA (40) *Nicotiana* (tütün) anterlerini kültüre alırken, kültür ortamına 27.8 mg/L konsantrasyonunda $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilavesiyle embriyolar elde etmişlerdir. Ayrıca ARMSTRONG ve GREEN (41) *Zea mays* (mısır) embriyo kültürlerinde, DATA ve WENZEL (42) *Triticum aestivum* (Buğday) embriyo kültürlerinde ortama Prolin ilave ettiklerinde, embriyo oluşumunun hızlandığını gözlemişlerdir. Bunun yanında FINER ve NAGASAWA (43) Soya fasülyesi embriyo kültürlerinde Glutamin veya Aspargin kullandıklarında embriyo oluşumunun durduğunu gözlemişlerdir. Buna karşılık, KINNERSLEY ve HENDERSON (44) *Daucus carota* (Havuç), OBENDORF ve SLAWINSKA (45) Soya fasülyesi embriyo kültürlerinde sakkaroz yerine maltoz kullandıklarında embriyo oluşumunun arttığını gözlemişlerdir.

Bitki doku kültürleri çalışmalarında verimi artırmak için birçok etkili metotlar tatbik edilmiştir. Örneğin, anter kültürlerinde kullanılan metotlardan biri de çiçeği kültüre almadan önce ön soğuklama işlemine tabii tutmaktır. Bu yöntemin özellikle tahıllarda etkili olduğu saptanmıştır. Nitekim SUNDERLAND ve ark. (46) *Hordeum* (Arpa), TSAY ve ark. (47) *Zea mays* (Mısır), MARSOLAIS ve ark. (48) *Triticum aestivum* (Buğday), WENZEL ve ark. (49) *Secale cereale* (Çavdar), CHEN ve ark. (50) *Oryza Sativa* (Pirinç) anter kültürlerinde embriyolar elde etmek için, çiçekleri 72 saat ile 4 hafta süreyle (+4)-(+10) °C ta bekleterek embriyo sayısının arttığını saptamışlardır.

1970' li yılların sonlarına kadar yapılan bitki doku kültürleriyle ilgili çalışmaların daha çok otsu bitkilerde yoğunlaştığını görüyoruz. Ağaçlarda vejetatif çoğalma ve organogenez üzerindeki çalışmalara bu yıllardan sonra tanık oluyoruz. DIALLO ve DUHOUX (51) organlaşmış bitki parçalarından itibaren vejetatif yolla bitkiler yetiştirmek (microprogasyon) amacıyla, jelozlu ortamda çimlendirdiği *Eucalyptus camaldulensis* (ökalıptus) tohumlarından elde ettikleri fidelerin hipokotil bölgelerini kültüre alarak bir sene zarfında bir tomurcuktan 10^{13} ten fazla sayıda köklenmeye hazır fideler elde etmişlerdir. Besleyici ortama regülatör madde olarak NAA ve BAP kullanmışlardır. Yine aynı yöntemleri kullanan DAVIES ve DUHOUX (52) *Acacia albida* (Akasya) 'nın çenek yapraklarına ait tomurcukları kültüre alındıktan 1 ay sonra çok sayıda sürgün ve bu sürgünleri de köklendirmek suretiyle kısa bir sürede çok sayıda fidan elde etmişlerdir.

Görüldüğü gibi ağaçlarda yapılan in vitro kültür çalışmalarında genellikle meristemler kullanılmıştır. Meristemlerin ,teorik olarak bitkilerin hayatları boyunca bölünebilme özelliklerini taşımakla, bitkilerin gelişmesinde kapital bir rol oynarlar. Bu hücre ve dokular kullanılmak suretiyle uygulanan in vitro çalışmaların aynı zamanda bir çok avantajları da vardır: Nesli tükenmekte olan materyallerin saklanması ,bitkisel materyallerin hastalıklardan arındırılması, materyalin besin gereksiniminin saptanması, gen aktarımı gibi faaliyetlerdir.

ROMBERGER ve ark. (53) *Picea* ve *Abiaste*, BEKKAOUI ve ark. (54) *Pseudotsuga menziesii* meristemlerini kültürde üretmişlerse de, yaşlı ağaçlarda pek iyi sonuç alamamışlardır. Bunun yanında WALKER ve ark. (55) *Sequoia sempervirens* (sekoya) ve *Pinus pinaster* (çam) 'ın 0,3-0,5 mm uzunluğundaki meristemlerini kültürde yetiştirmenin mümkün olduğunu göstermişlerdir.

İn vitro ortamda bitkilerin herhangi bir doku veya organından itibaren geliştirilen fideleri köklendirmek bazen sorun olmuştur. Fakat KEVERS ve ark. (56) *Fuchsia hybrida* (küpe çiçeği) bitkisinin değişik organlarını kültüre alarak, elde ettikleri 1 cm boyundaki fideleri 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren bir besi ortamına aktarmak suretiyle, 20 gün içerisinde köklü fideler elde etmişlerdir. Yine aynı şekilde BERTHON ve ark. (57) *Sequoiadendron giganteum* (sekoya) fidelerinden mikropropagasyonla % 50 randımanlı köklü bitkiler elde etmede NAA ve BAP kullanmışlardır. Keza BERTHON ve ark. (58) *sequiadendron giganteum* (sekoya) kültürlerinde, filtre edilmiş NAA'nın 1.5×10^{-4} M'lık konsantrasyonunda köklenme yüzdesinin en yüksek oranda olduğunu saptamışlardır. GASPARD ve ark. (59) Coniferlerde yaptıkları çalışmalarda IBA ve NAA'nın köklendirmeyi teşvik ettiğini göstermişlerdir.

Mikropropagasyonun, yukarıda değindiğimiz özelliklerinden başka bir amacı da gençleştirme işlemini gerçekleştirmektir. Nitekim DORENBOOS (60) *Hedera helix*'in genç bir bitki organı üzerine duvar sarmaşığının yaşlı bir meristemini aşıladığında apikal meristemin yeniden gençleştiğini görmüştür. Yine aynı şekilde FRANCLET (61) *Eucalyptus camaldulensis*'i (Ökalyptus) gençleştirmede uyumsuzluk risklerini minimuma indirmek için, tohumlardan elde ettiği 4-6 aylık anaçların üzerine 83 yaşındaki ağacın tomurcuğundan aldığı aşı parçalarını aşılayıp yetiştirmekle gençleştirmeyi sağlamıştır.

Görüldüğü gibi gençleştirme amacıyla yapılan aşılama işlemleri aynı zamanda vejetatif çoğalmanın bir şeklidirler.Yalnız, aşılama işlemlerinde bir takım uyumsuzluk risklerini ortadan kaldırmak için operasyonun gayet itinalı bir şekilde yapılması gerekmektedir.(62,63,64) Aşı yapılan anaç ve aşılanan kısım aynı fizyolojik yapıya sahip olmalıdır.Kambiyum ile aşı arasında iyi bir temas yüzeyi sağlanmalıdır.Ayrıca aşıların tatbik zamanı da ayrı bir önem arzeder.Örneğin ;armut aşısı sonbaharda ,güllerin aşıları genellikle mayıs ayında yapılmalıdır.

Yapılan aşı iyice tuttuğu zaman aşı ile anacın homolog dokuları tamamiyle kaynaşır ve vasküler sistemler kesintisiz ve kuvvetli bir şekilde bağlantı kurarlar.Aşı iyice tutmadığı hallerde, aşı bölgesinde bir nekroz meydana gelir ve sekonder düzeydeki semptomlar duruma bağlı olarak 1-2 sene içerisinde kendini gösterirler.Bu durumda aşı bölgesindeki neoformasyonda iletim demetlerinde çok zayıf olan kaynaşmadan dolayı anaç bitki ile aşı arasında bir iletilimsizlik başgösterir ve aynı zamanda aşı bölgesinde meydana gelen kitle ile anaç bitki arasında bir kavite meydana gelmekte ve bu da aşının aynı zamanda rüzgar gibi bir takım fiziki etkenlere karşı da dirençsiz kılmaktadır.

İşte yapılan bütün bu in vitro ve in vivo çalışmaları göz önüne alarak, yurdumuzda ve özellikle Güney Doğu Anadolu Bölgesi için büyük bir ekonomik değeri olan *Pistacia vera* L.(Antep fıstığı)'nı detaylı bir şekilde ele alıp,meristemlerinden itibaren özel MURASHIGE ve SKOOG (20) besi ortamı modifikasyonlarında

ve bugüne kadar hiç denenmemiş besi ortamlarında komple bitkiler elde etmek ve ayrıca aşılamanın bütün koşulları yerine getirildiği halde (62,63,64), aşıyla uyumsuzluk gösteren bazı ağaçları verimli hale getirmek amacıyla bu çalışmayı yapmaya karar verdik.

Yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda, zevkle araştırdığım bu konunun bana verilmesinde rol oynayan, çalışmalarımda her türlü yardım ve uyarılarını esirgemeyen, çalışmalarımı yönlendiren değerli hocam sayın **Prof. Dr. Davut BAŞARAN**'a en derin şükranlarımı bir borç kabul ederim.

II- MATERYAL VE METOT

A-MATERYAL :

Bu çalışmada, araştırma materyali olarak *Pistacia vera L.* (Antep fıstığı) kullanıldı. *Pistacia vera L.*, *Anacardiaceae* familyasına bağlı olup, $2n = 32$ kromozomludur. Tohumlarında yaklaşık olarak % 10 şeker % 20 protein ve % 50 oranında yağ bulunmaktadır. Antep fıstığı bitkileri kserofit bitkilerdir. Subtropikal iklimle iyice adapte olmuşlardır. Dioik bitkiler olup, bir takım varyasyonlar gösterirler. Her ne kadar dioik iseler de bazı hermafrodit varyetelerde tespit edilmiştir (65,66). *Pistacia vera L.* büyük ihtimalle orta asya orijinlidirler (67,68,69). İran, Türkistan ve Afganistan'da geniş alanlarda yabani *Pistacia vera L.* bitkileri tespit edilmiştir. Günümüzde hala en çok üretildikleri ve yayıldıkları alanlar olarak İran ve daha sonra Türkiye gelmektedir (70).

Antep fıstığı, tohumdan itibaren üretilir.Genellikle hafif kumlu topraklarda daha iyi gelişirler.5-6 yaşına gelen fidanların 2-2,5 cm çapındaki dallarına göz aşısı yapılır.Aşı yapılan fidanların büyük bir kısmı aşığı kabul eder ve bu aşıdan itibaren gelişen sürgünler meyveyi verecek olan ağacın taç kısmını meydana getirirler.10 yaşındaki ağaçtan artık meyve elde edilir.Antep fıstıkları 2 senede bir ürün verirler.Ürün vermeyen yılda çiçek tomurcuklarını geliştirirler.Normal gelişimini sürdüren 25-30 yaşındaki bir ağaçtan 40-50 kg /yıl ürün elde etmek mümkündür.Aşılanan fidanların bir kısmı aşığı tam olarak kabul etmezler.Yani anaç bitki ile aşı arasında doğan uyumsuzluktan dolayı gelişimini sürdüremezler.Bu bölgede bir yumru ortaya çıkmakta ve ağaç gelişmediğinden ürün bakımından da değeri neredeyse sifıra düşmektedir

Gerekli mücadele yapılmadıkça antep fıstıklarınının bir çok zararlıları vardır.Bu zararlılar bitkinin hayatına son verebilecekleri gibi, gelişmesine, meyvasına ve yapraklarına da büyük ölçüde zarar verebilirler.Bunlar arasında bir çok böcek ve kurtları Beyaz sinek ve koşnilleri, kök kurtlarını, kene ve mantarları ve hatta kuşlardan ağaçkakanları bile sayabiliriz.

B-METOT:

Araştırmalarımızla ilgili metodları iki kategoride mütalaa etmek mümkündür.

1-İn vitro koşullarda meristemlerden komple bitkiler elde edilmesi:

Bu çalışmada bitki doku kültürleri tekniği olarak GAUTHERET (71)nin metodları aynen uygulandı.Yapılan işlemleri sırayla şöyle açıklayabiliriz:

a-Cam malzemelerin sterilizasyonu:

Cam malzemeler (tüp, pipet, petri kutusu erlen mezür balon joje vs.) öncelikle sıcak suda deterjan ve sabun kullanılmadan fırça ile iyice yıkandılar. Daha sonra çeşme suyu ile yıkanıp 3 kez steril saf sudan geçirildiler. Bu malzemeleri bir sterilizatörde 150 °C ta 2 saat bekletmek suretiyle sterilize edildiler. Sterilize edilmiş cam malzemeler steril kağıtlara sarılıp muhafaza edildiler.

b -Pens ve bistürilerin hazırlanması :

Bunlar önce alkolle silindiler ve daha sonra 300 °C lık bir sterilizatörde 45 dakika bekletmek suretiyle sterilize edildiler.

c -Pamuk ve filtre kağıtlarının hazırlanması :

Pamuklar iki kat ambalaj kağıdına sarılıp otoklavda sterilize edildiler. Filtre kağıtları iki ayrı ebatta kesilip bir kaç tanesi 2 kat ambalaj kağıtlarına sarılarak otoklavda sterilize edildiler.

d-Besi yerinin hazırlanması :

Bunun için modifiye edilmiş MURASHIGE ve SKOOG (20) besi yeri kullanıldı. Bu besi yerinin bileşimi şöyledir:

MS Ana solusyonu :

Amonyum nitrat	:16.5 gr
Kalsiyum klorür .2H ₂ O	:4.4 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	:3.7 gr
KH ₂ PO ₄	:1.7 gr
Distile su	:1000 cc ye tamamlanır.

MS μ 1 Elemanları:

H ₃ BO ₃	:620 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	:2230 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	:1060 mg
KI	:83 mg
Na ₂ moO ₄ .2H ₂ O	:25 mg
Distile su	:1 litreye tamamlanır.

MS μ 2 Elemanları :

CuSO ₄ .5H ₂ O	:25mg
CaCl ₂ .6H ₂ O	:25mg
Distile su	: 1000 cc ye tamamlanır

Na EDTA :

Na ₂ EDTA	:3.73 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	:2.78 gr
Distile su	:1000 cc ye tamamlanır.

Vitamin Karışımı :

Nikotinik asit	: 50 mg
HCl Pyridoxine	: 50 mg
Glycine	: 200 mg
Distile su	:100 cc .

B1 Vitamini :

B1 Vitamini	:10 mg
Distile su	: 100 cc

İnositol solüsyonu:

İnositol	: 5 gr
Distile su	: 100 cc

Kinetin

Kinetin	:X mg
Distile su	:X cc

Naftalen Asetikasit (NAA)

NAA	: X mg
Etil alkol	: X cc

Bu bileşimlerden hazırlanan MURASHIGE ve SKOOG (20) besi

yeri şöyle düzenlendi:

Distile su	: 900 cc
Jeloz	: 10 gr
Sakkaroz	: 35 gr
MS Ana solusyonu	: 100 cc
MS μ 1 elemanları	: 10 cc
MS μ 2 elemanları	: 1 cc
Na EDTA	: 10 cc
Vitamin karışımı	: 1 cc
İnositol	: 2 cc
B1 Vitamini	: 1 cc
Kinetin	: 4 cc
NAA	: 1 cc

NOT : Bu besi yerinin PH sını 5.5 'a ayarlamak için orta:—
ma 1 molarlık KOH 'ten 1cc ilave edildi.

Hazırlanan bu besi yeri henüz sıcakken tüplere bölüştürüldü ve ağızları steril pamukla kapatıldıktan sonra sterilizatörde 115 °C ta 20 dakika bekletmek suretiyle sterilize edildiler.

e -Röpikaj ve kültür odalarının hazırlanması :

Röpikaj odası bir ultra viole lambası ,üzerinde ekim işlemlerinin gerçekleştirildiği bir masa ve yanında çalışılacak bunzen beki ile donatıldı.Ekim yapılmadan 5 saat önce yerler seyreltilmiş NaOCl ile (çamaşır suyu)itinalı bir şekilde silindi ve masanın üstü % 70 alkolle silinip, havaya alkol pülverize edildi. UV lambası da 3 saat süreyle açık bırakılarak odadaki sterilizasyon sağlandı.

Kültür odasına, üzerine tüplüklerin bırakılacağı raflar monte edildi. Ayrıca ısı ayarlaması için bir düzenek kurularak odanın ısısı 25 ± 2 °C ta sabit tutuldu .Duvara fluoresans lambaları takılmak suretiyle 3000 lük aydınlatma sağlandı ve ışıklar 24 saat açık bırakıldı.

f -Ekim ve Röpikaj işlemleri :

Bunun için öncelikle seçilmiş Antep fıstığı tohumları % 70 lik alkolde 30 saniye, % 3 lük NaOCl içerisinde 35 dakika bekletilerek sterilize edildiler.Bu ortamdan alınan tohumlar ,içerisinde steril saf su bulunan 4 ayrı kapta 5 er dakika yıkanmak suretiyle tohumların üzerinde bulunan NaOCl ten de arındırılmış oldular.Daha sonra steril tohumlar, içerisinde yalnızca % 10 luk jeloz içeren tüplere ekildiler.Ekimden sonra çimlenen ve 3-4 cm boya ulaşan fidanların epikotil bölgeleri steril bir ortamda alınarak daha önce hazırlanan MURASHIGE ve SKOOG (20) besi ortamı içeren tüplere aktarıldılar.Ekim işleminin hemen ardından tüplerin ağızları steril pamukla kapatıldı ve pamukların üstünde bir takım sporların olabileceği göz önüne alınarak yüzeyleri yakıldı ve parafilm ile kapatıldı.Bu şekilde hazırlanan tüpler 25 ± 2 °C ısıda ve 3000 lük ışıkla donatılmış (bu ışıklar 24 saat açık bırakıldı) kültür odasına bırakıldılar.

Ekimden sonra, epikotil bölgesinin lateral tomurcuklarından çıkan sürgünler yaklaşık 3 cm boya ulaşınca, ilk kültür işlemlerinde uygulanan sterilizasyon kurallarına riayet etmek koşuluyla, köklendirici ortama röpikaj edildiler. Röpikajda kullanılan köklendirici ortamın bileşimi şöyledir :

Distile su	: 900 cc
Jeloz	: 10 gr
Sakkaroz	: 30 gr
MS Ana solusyonu	: 100 cc
MS μ 1 Elemanları	: 10 cc
MS μ 2 Elemanları	: 1 cc
Na EDTA	: 10 cc
KOH	: 1cc

2-Aşı ile uyumsuzluk gösteren bazı antep fıstığı fidanlarının verimli hale getirilmesi :

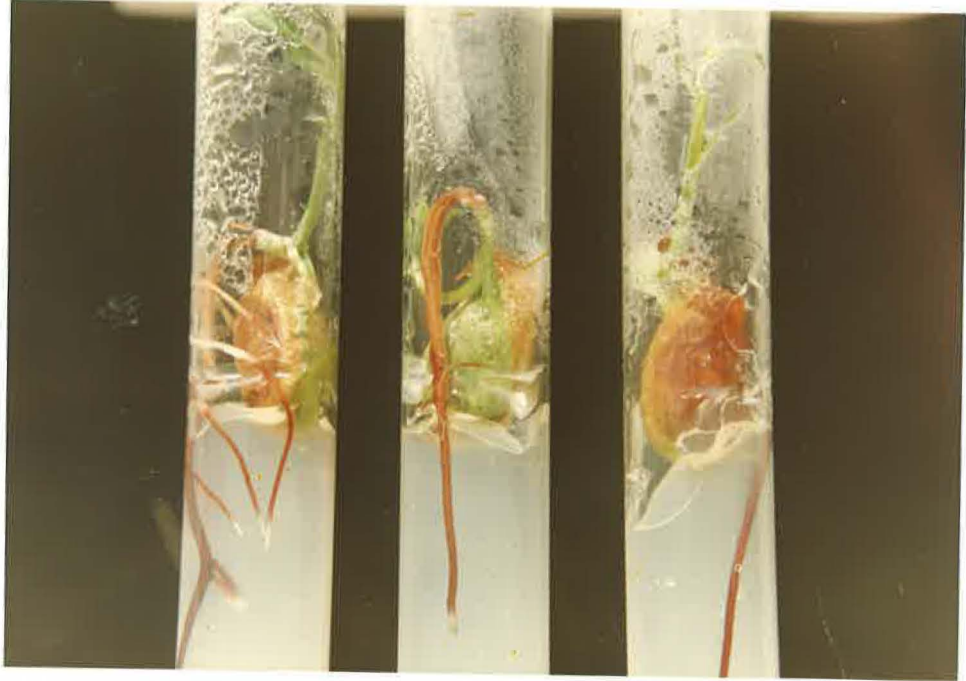
Bunun için göz aşısı yöntemleri uygulandı. Aşılama işlemlerinin tüm kuralları yerine getirildiği halde, aşı dönemine gelen antep fıstığı fidanlarının bir kısmı aşıyı kabul etmediler yani uyumsuzluk gösterdiler. Aşıyla uyumsuzluk gösteren fidanlara saflaştırma aşısı adını verdiğimiz aşıyı tatbik ettik. Saflaştırma aşısını ise; erkek antep fıstıklarından aldığımız bir gözünü yine bir erkek ağacın dalına tabik ettik, elde edilen bu işlemi test kros şeklinde 3-4 kez tekrarladıktan sonra elde ettik. Elde edilen bu bitki bir nevi klon bankası olarak işe yaramaktadır. Aşıyı kabul etmeyen fidanlara saflaştırma aşısını tatbik ettikten sonra, buradan gelişen sürgünün üzerine normal aşıyı uyguladık ve bu şekilde aşı ile anaç arasında mükemmel bir uyum sağlandı.

III -BULGULAR :

Yaptığımız bu çalışmada iki amaç gözlendiği için, araştırma sonuçlarını da iki alt başlık altında açıklamaya çalışacağız ;

A - İn vitro koşullarda meristemlerden itibaren komple bitkiler elde edilmesi :

Bunun için daha önce de bahsedildiği gibi antep fıstıklarının tohumları seçildi ve önce % 70 lik etil alkolde 30 saniye, sonra % 3 lük NaOCl içerisinde 35 dakika ve ardından steril saf suda 4 kez yıkanmak suretiyle sterilize edildiler.Bu tohumlar %10 luk jeloz içeren 60 tüpe steril bir ortamda ekildiler.Ekimden yaklaşık olarak 7-10 gün sonra tohumlar çimlendi ve 3-4 cm boya ulaştılar (Resim1).



Resim 1 -%10' luk jelozlu ortamda çimlenen antep fıstığı fidelerinin genel görünüşü

3-4 cm boya ulaşan fidanlar, gayet itinalı bir şekilde tüplerden alınıp petri kutuları içerisine aktarıldılar ve burada epikotil bölgeleri pens ve bistürilerin yardımıyla kesilip alındı. Alınan bu parçalar litrede 4 mg kinetin ve 1mg NAA (naftalen asetik asit) bulunan MURASHIGE ve SKOOG(20) besi ortamı içeren 60 tüp'e tek tek yerleştirildiler. Ekimden yaklaşık olarak 10-15 gün sonra aktarılan bu parçada bir proliferasyon gözlemlendi ve bu durum kendini şişkinlikler şeklinde ortaya çıkardı. Bundan yaklaşık 15 gün sonra şişkin kısımlardan sürgünler oluşmaya başladı ve kısa bir sürede hızlı bir gelişme gösterdiler (Resim 2).



Resim 2-Ekimden 30 gün sonra antep fıstığı fidesinin epikotil bölgesinden alınan sürgünlerin genel görünüşü.

Epikotil bölgesinden çıkan sürgünler 1.5-2 cm boya ulaşınca tüplerden alınıp, petri kutularının içerisine aktarıldılar, ve burada pens ve bistürilerin yardımıyla kesilip alındılar. Alınan bu gövdeleri köklendirmek için, köklendirici ortama aktarıldılar. İlk etapta köklendirici ortamı IAA ve daha sonraki köklendirici ortama NAA ilave edildiği halde köklenme sağlanamadı.

Bunun üzerine hiç hormon içermeyen besleyici bir ortama aktarıldılar. Aktarma işlemleri de tamamen steril olan bir ortamda gerçekleştirildi (Resim -3).

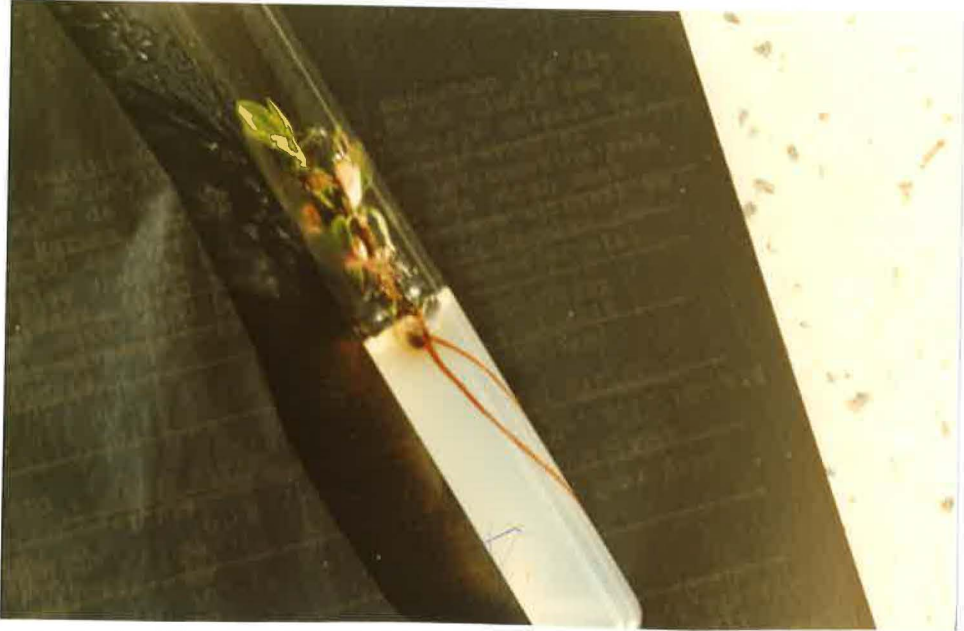


Resim 3-Kök oluşumunu sağlamak için köklendirici ortama aktarılan bir gövdenin genel görünüşü.

Köklendirici ortama aktarılan bu gövdeler ilk etapta uzunlamasına bir gelişme gösterdiler. 3-4 cm boya ulaştıktan sonra bu gövdelerin alt kısımlarında yani köklendirici ortama gömülü olan yerlerinden küçük tomurcuk benzeri oluşumlar ortaya çıktılar .Daha sonra bu kabarcıklar, 15-20 gün içerisinde köklere dönüşüp, hızlı bir gelişmeyle tam teşekküllü bir kök sistemine ulaştılar. (Resim -4) Böylece meristemden itibaren köklü fidanlar elde edilmiş oldu.

Bu şekilde elde edilen köklü fidanlar tohumların ekiminden yaklaşık 70-75 gün sonra tüplerin içerisinde çıkarıldılar ve funda toprağı içeren saksılara aktarıldılar.Fideler % 80 rutubetli bir ortamdan çıkarıldığı için,saksılarda da rutubetlerini korumaları bakımından üzerlerine plastik torbalar geçirildi. Dış ortamla tema-

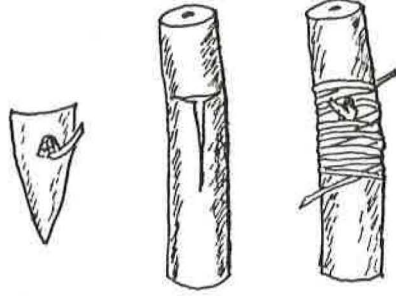
sını azaltmak ve aynı zamanda fideleri doğal şartlara adapte etmek için plastik torbalar üçüncü günden itibaren günde bir saat veya biraz daha fazla olmak üzere açık bırakıldılar. Böylece fidanların doğal şartlara adaptasyonu sağlandı. Funda toprağına aktarıldıktan 15 gün sonra saksıların üzerlerindeki plastik torbalar tamamen çıkarıldığı halde fidanların tamamen uyum sağladıkları ve hızlı bir gelişme gösterdikleri saptandı.



Resim 4- Köklendirici ortamda meristemden itibaren elde edilen köklü bir fidenin genel görünüşü.

B-Aşıyla uyumsuzluk gösteren bazı antep fıstığı fidanlarının verimli hale getirilmesi :

Daha önce de bahsettiğimiz gibi 5-6 yaşına gelen antep fıstığı (*Pistacia vera L.*) fidanlarına göz aşısını tatbik etmek gerekmektedir. Göz aşısı Resim-5'te gösterildiği gibi, verimli bir dişi ağacın 2 yaşındaki genç bir sürgünü üzerindeki bir göz, etrafındaki bir miktar kabuk ile alınır. Diğer taraftan üzerine aşı yapılacak olan fidanın 2-2.5 cm çapındaki dalının yüzeyinde T şeklinde bir yarık açılır. Daha sonra göz etrafındaki kabuk ile beraber bu yarığa yukarıdan aşağıya kabuğun altından kaydırmak suretiyle yerleştirilir ve etrafı bir bez ile normal bir şekilde sıkılarak bağlanır. Kullanılan bu bez, daha önce DDT gibi bir haşere ilacına bulaştırılırsa gövde üzerine açılan bu yarıya bir takım haşerelerin bulaşma riski de minimuma indirgenir.



Resim 5- Göz aşısının tatbık şekli.

Bütün bu kurallara riayet edildiği halde bazı antep fıstığı fidanları (yaklaşık % 10) yapılan bu aşı ile uyumsuzluk göstermektedirler(Resim-6,7).Bu fidanların aşı yapılan bölgelerinde uyumsuzluğun belirtileri olan bir takım morfolojik semptomlar hemen ilk yılda kendilerini gösterdiler.İlk belirti,yapılan aşının anaç gövdesi ile tam bir kaynaşma göstermeyen bir kitle şeklinde olmaktadır.Aynı zamanda bu bölgede bir nekrozun da ortaya çıktığı tespit edildi.



Resim 6-Aşıyla uyumsuzluk gösteren 35 yaşındaki bir antep fıstığı ağacındaki kitlenin genel görünüşü.

Bu ilk belirtilerden daha sonraki yıllarda sekonder bir takım belirtiler ortaya çıkmaya başladı. Bu bölgede aşılama kısmı ile anaç arasında tam bir iletişim sistemi sağlanamadığından, aşıdan çıkan sürgünün beslenmesi de çok yetersiz olmakta ve buna bağlı olarak gelişmesinde de çok cılız kalmaktadır. Anaç üzerine yapılan aşı ikinci yılda daha da şişkinleşerek 5-6 cm çapında bir kitle haline dönüştü ve anacın gövdesiyle arasında bir kavite oluştu. Bu gözden çıkan sürgün de kararmaya başladı.



Resim 7- Aşıyla uyumsuzluk gösteren bir fidanda aşılama sonrası oluşan 2 yıllık bir kitlenin genel görünüşü.

Uyumsuzluk gösteren bu aşıdan itibaren filizlenen sürgünlerin gelişimi o kadar zayıftı ki Resim 7'de görüldüğü gibi uyumlu bir aşıdan itibaren gelişen 3 yıllık bir sürgünün gösterdiği gelişme, uyumsuz bir aşıdan itibaren filizlenen 6 yıllık bir sürgünden iki kat daha fazla bir gelişme gösterdiği gözlemlendi. Bu gelişme farklılığı ağacın yaşı ilerledikçe kendini daha

bariz bir şekilde göstermektedir. Resim 9'da da görüldüğü gibi uyumlu bir aşıdan kaynaklanan 4 yıllık bir sürgün, uyumsuz bir aşıdan kaynaklanan 30 yıllık bir sürgünün gelişimi ile mukayese edildiğinde, hemen hemen aynı boyda oldukları tespit edildi. Bunun dışında, uyumsuzluk gösteren bir aşıdan itibaren gelişen sürgünün vermiş olduğu bir ağacın ürün miktarı ve kaliteside çok farklı olmaktadır. Normal gelişimini sürdüren 30 yaşındaki bir ağaçtan yaklaşık olarak 40-50 kg/yıl kalitesi ve kanditesi yüksek ürün elde edilirken, aynı yaştaki uyumsuz bir sürgünden gelişen bir ağaçtan ancak 6-7 kg/yıl ürün elde edilebilmektedir. Aynı zamanda bu ürünün kalitesi de çok daha düşük olmaktadır.



Resim 8-Uyumlu ve uyumsuz aşılardan gelişen sürgünlerin karşılaştırmalı görünüşü.

- a-Uyumsuz bir aşıdan gelişen 6 yıllık bir sürgün
 b-Aşıyla uyumsuzluk gösteren bir dalın üzerine yapılmış saflaştırma aşısından gelişen 3 yıllık bir sürgün



Resim 9-Aşıyla uyumsuzluk gösteren bir ağacın üzerine yapılan saflaştırma aşısının ardından tatbik edilen aşıdan gelişen ağaç ile uyumsuz bir aşıdan gelişen ağacın kaşılaştırılması.

a-Saflaştırma aşısının ardından tatbik edilen aşıdan gelişen 4 yıllık bir gövde.

b-Uyumsuz bir aşıdan gelişen 30 yıllık bir gövde.

Daha önce de bahsedildiği gibi, aşılamanın bütün kuralları yerine getirdiği halde ortaya çıkan bu olumsuz durumu telafi etmek için saflaştırma aşısı adını verdiğimiz şekilde saflaştırma aşısı adını verdiğimiz aşıyı uygulamaya koyduk. Bunun için, elde edilmiş elde edilmiş metoduna daha önce değindiğimiz şekilde, saflaştırma aşısını elde ettik. Diğer yandan aşıyla uyumsuzluk gösteren fidanın gereksiz eski sürgünlerini kesmek suretiyle bu fidandan yeni sürgünlerin filizlenmesini sağladık. Yeni süren bu sürgünlerden Temmuz ayı içerisinde 2-2.5 cm çapına erişenlerin üzerlerine saflaştırma aşısı adını verdiğimiz aşıyı tatbik ettik. Bu aşılamanın uygulama şekli normal göz aşısı metodlarıyla aynıdır.

Bu aşı gözünden çıkan sürgünler diğer aşılardan çıkan sürgünlere nazaran daha sağlıklı ve hızlı bir gelişme göstermektedirler. Öyle ki 2 yıl sonra üzerlerine aşı yapılacak kalınlığa eriştiler. Bu sürgünlerin üzerine göz aşısı tekniklerine uygun bir şekilde normal dişi ağaçtan alınan göz aşısını uyguladık. (Resim 10) Böylece normal aşı ile uyumsuz olan fidanların yapısı değiştirilerek % 100 randımanlı bir şekilde aşığı kabul eder hale getirdik. Bu aşamadan sonra aşı gözünden çıkan sürgünler, gayet düzenli bir gelişme gösterdiler.



Resim 10-Aşıyla uyumsuzluk gösteren bir fidanın ıslahı için yapılan bütün aşıların fidan üzerindeki konumları.
 a- Aşıyla uyumsuzluk gösteren dişi (♀) ağaç.
 b- Uyumsuz ağaç üzerine yapılan saflaştırma (♂) aşısı.
 c- Saflaştırma aşısından çıkan sürgün üzerine yapılmış verimli dişi (♀) aşı.

IV-TARTIŞMA VE SONUÇ :

Pistacia vera L. (Antep fıstığı) nin kullanıldığı bu çalışmada iki amacımız oldu ;Bunlardan ilki, meristemlerden itibaren in vitro koşullarda mikropropagasyonla yeni fertler elde etmek, ikincisi ise, in vivo koşullarda yetiştirilen fidanların aşılma dönemine gelip aşılıla uyumsuzluk gösteren bitkilerin verimli hale getirilmesidir.

Bunun için tohumlar % 10 luk jelozlu ortamda çimlendiler ve çimlenen bu fidanların epikotil bölgeleri kesilip alındı. Alınan bu epikotil bölgeleri GAUTHERET(71) yöntemlerine göre kültüre alındılar. Kültür ortamı olarak modifiye edilmiş MURASHIGE ve SKOOG (20) besi yeri kullanıldı. Bu ortama regülatör madde olarak 4 mg /L kinetin ve 1 mg / L NAA ilave edildi. Bu ortamda elde edilen gövdeler köklendirici ortama aktarılmak suretiyle köklü bitki elde edildi. Kültür odasında uygulanan ışık 3000 lüx'lük ışık olup 24 saat açık bırakıldı. Aynı zamanda kültür odasının ısısı 25 ±2 °C ta sabit tutuldu. Diğer yandan aşılıla uyumsuzluk gösteren *Pistacia vera L.* (Antep fıstığı) fidanlarına saflaştırma aşısı adını verdiğimiz aşılıla tatbik etmek suretiyle, dışı ağaçlardan alınan normal göz aşısını kabul eder hale getirdik.

Daha önce yapılan in vitro çalışmalara dikkat edilirse, bu tür çalışmaların daha çok otsu bitkiler üzerine yoğunlaştığı gözlenmektedir. Ağaçlarda meristemlerden itibaren komple bitkiler elde etmek elbetteki mümkün olmuştur(53,54,55). Fakat yurdumuz ve özellikle bölgemiz: GüneyDoğu Anadolu bölgesi için özel bir öneme haiz antep fıstıklarıyla ilgili kayda değer pek önemli bir in vitro çalışmaya rastlanamadı.

Bu, çalışmayla ilk kez *Pistacia vera L.* (Antep fıstığı) meristem dokularında organogenez faaliyetlere tanık olduk. Özellikle-

le kollogenez ve bilahare in vitro MURASHIGE ve SKOOG (20) besi ortamlarına gerek IAA ve gerekse NAA'ı yerleştirmek suretiyle rizogen yani kök oluşumu olaylarını gerçekleştirmek istedik. Ne yazık ki bu iki köklendirici hormonla, hiç bir sonuç alamadık. Halbuki daha önce yapılan çalışmalarda (56,57,58,59) köklendirme işleminde köklendirici hormonlar olarak bilinen NAA, BAP ve IBA'ı kullanmışlardır. Biz ise, fideleri köklendirmek için ortama yalnızca MURASHIGE ve SKOOG (2) çözeltisinin organik ve inorganik elemanlarını yerleştirmek suretiyle köklenmeyi sağladık.

Bu güne kadar gerçekleştirilen bütün in vitro çalışmalarda ya fotoperiyodisite yani 16 saat ışık 8 saat karanlık uygulanmış veya tamamen karanlık ortamda ve optimum gelişme sıcaklığında bekletilmiştir. Biz ise burada dünyanın hiçbir tarafında uygulanmayan devamlı bir ışık şidetine tabi tutmak suretiyle organenez faaliyetlerini gerçekleştirecek değişik bir yöntem bulmuş olduk.

Çalışmamızda bununla da yetinmeyip, aşı dönemine gelip aşıyla uyumsuzluk gösteren antep fıstığı fidanlarına saflaştırma aşısını uygulamak ve bunun ardından göz aşısını tatbik etmek suretiyle, verimsiz olan fidanları islah ederek verimli hale getirmiş bulunuyoruz. Öyle ki sadece bir ağaçtan 6 -7 kg/yıl ürün yerine 40-50 kg /yıl ürün elde etmekle Türkiye ve özellikle bölgemiz ekonomisine büyük katkıda bulunacağına inanıyoruz.

Sonuç olarak son zamanlarda büyük bir önem kazanmış ve araştırmacıların, özellikle botanist ve farmakologların sempati duyduğu biyoteknolojinin basit bir yöntemini Diyarbakır şartlarında uygulamak suretiyle antep fıstığı meristemlerinden itibaren ileride gerçekleştirmesini düşündüğümüz seri fidan üretimine ışık tutacak olan ve aşılamayla kaybolan zamanı ve mekanı minimuma indiren bir sistemin zincirlerinin halkasına bir yenisini ilave ettiğimiz kanısındayız.

Y-ÖZET :

Araştırma materyali olarak antep fıstığı (*Pistacia vera* L.)nın kullanıldığı bu çalışmada iki amacımız oldu: Bunlardan ilki antep fıstığı meristemlerinden itibaren in vitro koşullarda mikropropagasyonla yeni fertler elde edilmesi, ikincisi ise normal in vivo koşullarda yetiştirilen fidanların aşı dönemine gelip aşığı kabul etmeyen bitkilerin verimli hale getirilmesidir.

Böylece, çimlendirilen tohumlarda elde edilen fidanların epikotil bölgeleri GAUTHERET (71) yöntemine göre kültüre alındı. Kültür ortamı olarak MURASHIGE ve SKOOG (20) besi yeri kullanıldı. Bu besi yeri, kinetin (4 mg / L) ve NAA (1 mg / L) ile desteklendi. Bu ortamda, epikotil bölgelerinin meristemlerinden geliştirilen gövdeler, hormonsuz ortamda köklendirilmek suretiyle köklü antep fıstığı bitkileri elde edildi. Diğer yandan aşığı kabul etmeyen antep fıstığı fidanlarına saflaştırma aşısı yapılmak suretiyle aşığı kabul eder verimli fidanlar elde edildi.

VI- SUMMARY:

We had two purposes in this study of pistachio (*Pistacia vera* L.) as was being used researching material. First of those was to obtain the new seedlings from the meristems of pistachio in vitro conditions by micropropagation, although the second one was the amelioration of the seedlings which refused the graft in vivo condition in grafting period. Therefore, the epicotyl zones of the seedlings which were obtained from the germinated nuts, were placed to culture medium according the method of GAUTHERET(71). As culture medium was used MURASHIGE and SKOOG(20) medium.

This medium has been supplemented kinetin (4 mg/L) and NAA (1 mg/L). In this medium, the shoot which were developed from meristems of the epicotyl zones, have been rooted as pistachio provided in absence hormones medium. On the other hand, the seedlings which refused the graft, were made the graft of purification and then were provided graftable and productive seedlings.

VII -KAYNAKÇA

- 1-HABERLANDT,G. -Kulturversuche mit isolierten pflanzen .Sitzungsb.Acad. Wiss.Wien.Math-Natur. Kl. ,111,69-92.1902
- 2-BOBILIOF-PREISSER,W-Beobachtungen an isolierten palissaden und schampparenchym zellen. Beilh .2.Bot.Zbl., 33,248-274.1917
- 3- KNUDSON,L -Viabilit of detached root-cup cells .Amer .Jour . Bot . ,6 , 309-310 .1919 .
- 4-THIELMANN ,M -Veber Kulturversuche mit spaltöffnungszellen . Ber .d .d .Bot.Gessel.,42,423-433 .1924.
- 5-THIELMANN ,M-veber Kulturversuche mit spaltöffnungszellen . Arch . exp .Zellf .,1,66-107. 1925.
- 6- THEIELMANN ,M-Cultures de stomates .C.R.Soc .Bicl., 92 ,888.1925.
- 7-CZECH,H.-Kulture von pflanzlichen gevebszellen .Arch .Exp .Zellf . , 3,176-199. 1926
- 8 -KUNKEL ,W-Ueber die kultur von perianthgeveben . Arch .Exp .zellf ., 3,405 . 428. 1927.
- 9-KEMMER, E-Beobachtungen uber die lebensdauer isolierten epidermen .Arch .exp.zellf.,7,1-68.1928 .
- 10-PFEIFFER ,H.-Bedbachtungen an kulturen nackter zellen ous pflanz lichen beerenperikarpien .Arch .exp .zellf .,11,424-434.1931 .
- 11-GAUTHERET ,R .J:Cultures de cellules detachees de la coiffe . C.R.Acad .Soc . ,196 ,638-640.1933 .
- 12-GAUTHERET ,R.J.-Acton de la racine sur la survie des cellules isolees de coiffe de lupinus albus .C .R .Acad .Soc . ,204,887-889 .1937
- 13-GAUTHERET ,R .J.-Nouvelles experiences bur la croissance des cellules isolees de caiffe de Lupinus albus .Ibid. ,132 ,351-352 .1939 .
- 14-GAUTHERET , R.J.-Action de l'acide indolacetique sur les tissus du tubercule de carotte .C.R.Soc Biol . ,130,7-9 .1939
- 15-MOREL ,G-Recherches sur la culture associee de parasites obligatoires et de tissus vegetaux. These ,Paris,112 pp .et Ann .Epiphyt.,N.S .,14 ,123-235.1948.

- 16-MUIR, W.H., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J.—Plant cultures produced from single isolated cells .Science., 119, 877-878.1954.
- 17-TORREY ,J.G.—Cell division in isolated single plant cells in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci., 43, 887-891. 1957.
- 18-JONES, L.E., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J.—Growth of somatic Tobacco cells in microculture. Amer. Jour.Bot., 17, 468-475. 1960.
- 19-LUTZ, A:Description d'une technique d'isolement cellulaire en vue de l'obtention de cultures de tissus vegetaux provenant d'une cellule unique.C.R.Acad.Soc.,256,2676-2678.1963.
- 20-MURASHIGE, T., SKOOG ,Fb:A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures .Physiol .Plant ., 15.473-497.1962.
- 21-MAURAS. A:Contribution a l'etude du determination de l'embryogenese somatique chez la carotte sauvage cultivee in vitro These, Bordeaux.58 PP.989. 1972.
- 22-BAŞARAN, D:Evolution des proprietes organogenetiques des cultures de tissus de tabac au cours de leur developement. These, Bordeaux, 62 PP. 1175.
- 23-WHITE, P.R.—Controlled differantiation in a plant tissue culture. Bull. Torrey Bot. Club, 66, 507-513. 1939.

- 24-GAUTHERET,R.J:Recherches sur la bourgeonnement du tissu cambial J'Ulmu^s campestris cutt^{iv}e in vitro.C.R.Acad .Soc.,210,632-634.1940.
- 25-SEGRETAIN,G.-Formation de cal^s en milieu aseptique a partir de fragments de tiges de tobac.C.R.Soc.Biol., 135,648-649.1941.
- 26-SKOOG,F:Growth and organ formation in tobacco tissu culture.Amer.Jour.Bot.,31,19-24.1944.
- 27-SKOOG,F.,TSUI,C:Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments an callus cultured in vitro.Emer.Jour.Bot.,35,782.787.1948.
- 28-JACQUIOT,C:Action du meso-inositol et de l'adenin sur la formation des bourgeons par la tissu cambial d'ulmu^s campestris cultive in vitro.Ibid.,233,815-817.1951.
- 29-DAS,N.K.,PATAU,K.,SKOOG,F:Initiation of mitosis and cells division by kinetin and Indole acetic acid in excised tobacco Pith tissue.Physiol.Plant.,9,640-651.1956.
- 30-SKOOG,F.,MILLER,C.O.- Chemical regulation of growth and formation in plant tissues cultured in vitro.Symp.soc.exp.biol.,11,118-131.1957.
- 31-WU,C.T:Studies on the tissue culture of tea plant.Bull.Taiwan tea exp.stat.,72,30-42.1976.
- 32-GUHA,J., MAHESHWARI,S.C:In vitro production of embryos from Datura.Nature.London.212pp.497.1964.

- 33-HALPERİN,W.,WETHERELL,D.F:-Adventif embryon in vitro tissue culture of the wild carrot.amer.Jour.Bot.,51,274-28.1964,
- 34-BAŞARAN,D:-Nicotiana tabacum L.cu.Siirt'in pistil ve stamenlerinden in vitroolarak embriyo elde edilmesiarastırmaları. TBTAk .VII.Bilim kongresi.1980.
- 35-STUART,D.A.,STICKLAND,S.G.,WALKER,K.A:-Bioreactor production of alfalfa somatic embryos.Hort.Sci.,22,800-803.1987.
- 36-LAZZERİ,P.A.,HILDEBRANDT,D.F.,COLLINS,G.B:-Soybean somatic embryogenesis:Effects of hormone and culture manipulations.Plant cell.Tiss.Org.Cult.,10,197-208.1987.
- 37-BAŞARAN,D.,ONAY,A.,ÇOLAK,G.,YÜCEL,S.,ATALAY,D.A:-2..4-D'li MS besi ortamlarında in vitro olarak kültüre alınan Nicotiana tabacum L.Var."Plg"tütün suşlarından izole edilen hücrelerden gerçekleştirilen I.Ve II .senerasyon bitkilerin özelliklerinin araştırılması.X. Ulusal Biyoloji Kongresi.Erzurum.1990.
- 38-BAŞARAN,D.,ÇOLAK,G.,NAMLI,D.,YÜCEL,S.,ATALAY,D.A.,ONAY,A:-2mg/L IAA ve Kinetin içeren MS besi ortamlarında in vitro olarak yetiştirilen bir hücre kökenli Nicotiana tabacum L.var."Plg" tütününden elde edilen bitkilerin morfolojik özellikleri üzerinde araştırmalar .SBAD.,1,7-14.1990.
- 39-JOHRI,B.M.,SEHGAL,C.B:-In vitro production of neomorphs in Anethum graveolens L.Nature.,205,1337.1965.
- 40-HAVRANEK,P.,VAGERA,J:-Regulation of in vitro androgenesis in tobacco through iron-free media.Biologia plantarum.,21,412-417.1979.
- 41-ARMSTRONG,C.,GREEN,C:-Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline.planta.,164,207-214.1985.
- 42-DATTA,S.K., WENZEL,G:-Isolated microspore derived plant formation embryogenesis in Triticum aestivum L.plant.Sci.,48.49-54.1987.
- 43-FINER,S.S.,NAGASAWA,A.-Development of an embryogenic suspension culture of soybean(Glycine max merrill) plant cell.Tiss.Org.Cult.,15,125-136.1988.

- 44-KINNERSLEY,A.M.,HENDERSON,W.E-Alternativ carborhydrates promote differentiation of plant cells.plant.cell.Tiss.Org.Cult.,15,3-16.1988.
- 45-OBENOORF,R.L.SLAWINSKA,J.Maturation of soybean somatik embryos to a dessicaton tolerant stte. in vitro cell dev.Biol.,24.71A.1988.
- 46-SUNDERLAND,N.,XU.Z.H.,HUAN,B-Recent advances is barley ant-her cultur.Barley Genet.4,Proc.Int.Symp.,4 th,pp.599-603.1981.
- 47-TSAY,H.S.,MIAD,S.H.,WIDHOLM,S.M-Factors effecting haploid plant regeneration from maize anther culture.j.plant physiol.,126,33-40.1986.
- 48-MARSOALIS,A.A.,SEGUIN-SWARTS,G.,KASHA,K.J-The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotype on in vitro androgenesis in wheat.plant cell.Tissue and organ culture.,3,69-79.1984.
- 49-WENZEL,G.,HOFFMANN,F.,THOMAS.E-Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye.Theor.Appl.Genet.,51,81-86,1977.
- 50-CHEN,Y.,ZUO.Q.,LI,S.,LU,D.,ZHENG,S. - Green plants regenerated from isoluted ric pollen grains in vitro and the induction factors.Acta Genetica sinica .,8,158-163.1981.
- 51-OTALLO.N.,DUHOUX,E-Ornogenese et multiplication in vitro chez l'Eualyptus comalclulensis .J.plant.physiol .115,177-282. 1984 .
- 52-DAVIES ,A.DUHOUX, E.-Caulogenese a partir de borgeons cotyledonaires d'Acacia albida et influence du saccharose sur la rhizogenese.J.plant physiol. 1985.

- 53-ROMBERGER ,T.,VANELL,R.,TABOR,C.-U.S.D.Ü. Tech.Bull.1409,1-30.1970.
- 54-BEKKAOUI, F.,FRANCLET,A.,WALKER,N:Ann.AFFOCEL.45-74.1984.
- 55-WALKER,N.,DUMAS,E.,FRANCLET,A.BEKKAAOUI,F. Ann.AFFOCEL.87-110.1984.
- 56-KEVERS.CI.,COUMANS-GILLES.M.F.,COUMANS.M.,GASPAR,Th:In vitro vegetative multiplication of Fuchsia hybrida.sci.Hort.,21,67-71.1983.
- 57-BERTHON,S.Y.,MALDINEY,R.,SOTTA,B.,GASPAR,Th:Endogeneous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings in of seguoidendron giganteum in vitro.Biochem.Physiol.Pflunzen.,184,405-412.1989.
- 58-BERTHON. J.Y.,BOYER,N.,GASPAR,Th: Brief and long NAA rooting inductive treatments in seguoiadenndron giganteum and the effect of auxin autoclaving.Med.Fac.Landbouww.Risksuni v.Genet.54/20,403-407.1989.
- 59-GASPAR,Th.,COUMANS,M. - Root formation.Ref.B.Vol.2.PP.202-217.1987.
- 60-DORENBOOS,J.-Rejuvenation of Hedera helix in graftcombinations pnev.,115.wageningen.1953.
- 61-FRANCLET,A:Rajeunissement des arbres adultes en uue de leur propagation vegetative.In :Micropropagation des arbres forestien.AFOCEL.21-18.Etudes et Recherches,3-18.1979.
- 62-GARNER,R.J:Studies in nurjery technigue.The production of double worked pear trees.Ann.Rpt.East.Malling Res.Sta.for/939.pp.84-86.1940.
- 63-NICOLIN,P:Nicolieran,a new method of grafting,Deutsche Baumschule,5,186-187. 1953.

- 64-CHAMPAGNAT,P.,OZENDA.P.,BAILLAND,L. - Biologie vegetale,croissance,Morphogenese et reproduction. Masson et cie.1969.
- 65-OZEBEK,S.,AYFER.M-An hermaphrodide pistachio found in the vicinity of Antip,Turkey.Proc.Am.Soc.Hortic.sci.,72,240-241.1953.
- 66-CRANE,J.C. - Hermaphroditism in Pistacia.cal.Agric.,28,3-4.1974.
- 67-WHITEHOUSE,W.E-The pistachio nut-a new crop for the western United States.Econ.Bot., 11,281-321.1957.
- 68-JOLEY,L.E:Pistachio.In: jaynes RA(ed) Handbook of North American nut trees.Northern nut grover Assoc.Knoxville.PP.348-361.1969.
- 69-RECHINGER.K.H:Flora Iranica-Flora des iranica-Flora des iranischen Hochlandes undder umrahmenden Gebirge.Akad.Druck-8L verlagsanst.Graz.1969.
- 70-FAO.Production yearbook.FAO,Rome.1984.
- 71-GAUTHERET .R.J.-La Culture des tissus vegetaux. 1vol, masson Ed. Paris,863 PP.1959.