

ANTEPFISTIĞI' NDA  
DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS İLE  
KLONAL ÇOĞALTMA

Yüksek Lisans Tezi

730894

Biyoloji Bölümü  
Gaziantep Üniversitesi

Ülkü BALOĞLU

Mayıs 2003

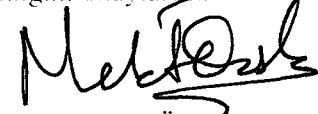
Y.Ü. GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
KÜTÜPHANE

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

**GÖNÜL**  
Prof. Dr. Bülent GÖNÜL

(Unvan ve İsim)  
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

(Unvan ve İsim)  
Bölüm Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

(Unvan ve İsim)  
Danışman

Sınav Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Yrd. Doç. Dr. Canan CAN

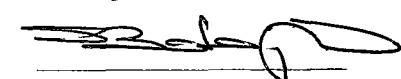
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU (Çukurova Üniversitesi)

Doç. Dr. Elman İSKENDER

Yrd. Doç. Dr. İsmail VAROL











**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ**  
**ONAY KAPAKÇIĞI**

## ÖZ

### ANTEPFISTIĞI' NDA DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS İLE KLONAL ÇOĞALTMA

BALOĞLU, Ülkü

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Mayıs 2003, 53 sayfa

Ülkemiz, Antepfıstığı'nın dünyadaki gen merkezi üzerindedir. Bu nedenle, Antepfıstığı, özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde çok eski yıllardan beri yetiştirilmekte ve bölge ekonomisine önemli katkılarda bulunmaktadır. Antepfıstığı, özellikle yağ ve protein oranı yüksek bir meyvedir ve oldukça fazla konsantre besin değerine sahiptir. Heterozigotik yapısı nedeniyle, üretiminde sadece vegetatif çoğaltma yöntemleri önem kazanmaktadır. Köklenme zorlukları nedeniyle çelik ve daldırma gibi vegetatif çoğaltma yöntemlerinin kullanılamaması farklı aşı tekniklerini ön plana çıkarmıştır. Ancak bu yöntemin yavaş ve pahalı olması yeterli sayıda çoğaltım materyali eldesini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle Antepfıstığı anaç ve çeşitlerinin yoğun klonal çoğaltımında, diğer türlerde olduğu gibi, yeni bir teknik olan doku kültürlerinin kullanılma olanakları araştırılmaktadır. Bununla birlikte, Antepfıstığı'nda bulunan fenolik bileşikler doku kültürü tekniklerinin uygulanabilirliğini negatif yönde etkilemektedir. Bu çalışmada, *Pistacia vera* L. cv Siirt'te ilk kez 'nurse culture' tekniği ile *in vitro* fenolik bileşiklerin engellenmesi üzerinde araştırmalar yapılmış ve bu amaçla döllenmiş embriyolar ve sürgün meristemleri kullanılmıştır. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı ikinci yarısında alınan döllenmiş embriyolardan en yüksek oranda direk somatik embriyogenesis elde edilmiştir. *Nicotiana tabacum* cv Samsun kalluslarının fenolik bileşikleri engellediği belirtilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doku kültürü, *Pistacia*, nurse culture, fenolik bileşikler

## ABSTRACT

### CLONAL PROPAGATION THROUGH DIRECT SOMATIC EMBRIOGENESIS IN PISTACHIO

BALOĞLU, Ülkü

M. Sc. in Biology.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

May 2003, 53 pages

Our country is on the 'gene center' in the world for Pistachio. For this reason, especially, the Pistachio was grown in the Region of Southeastern Anatolia for many years and is the most important for the economy of this region. *Pistacia vera* L., is a fruit which has high in fat/protein ratio. It has a high quality nutrition value. Due to heterozygosity only vegetative propagation methods give promising results in propagation of Pistachio trees. Different grafting and budding methods must be employed since vegetative propagation methods such as cutting and layering cannot be used due to difficulties in rooting. However this method is slow and expensive thereby limiting the number of propagation materials. For this reason, in intensive clonal propagation of Pistachio nut rootstocks and varieties the possibilities of application of tissue culture methods are investigated. Together with this, the phenolic compounds exist in *Pistacia vera* L. effects the applicability of tissue culture techniques in negative way. In this study, investigations were done for the first time on obstructing of phenolic compounds *in vitro* by using 'nurse culture' techniques in *Pistacia vera* L cv Siirt. For this aim fertilized and ovules and shoot meristems were used. Direct somatic embryogenesis at the highest ratio was obtained from the fertilized embryos which was taken at the growing period of second half of 2002 July. It was pointed out that calli of *Nicotiana tabacum* cv Samsun obstructed phenolic compounds.

**Key words:** Tissue culture, Pistachio, nurse culture, phenolic compounds

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne,

Tez araştırmaları için Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün bütün imkanlarını sunan, saygıda ve değerinde üstün tuttuğum danışman hocam, Bölüm Başkanımız Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a,

Çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Canan CAN'a,

Materyal temininde yardımcı olan Antep Fıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yard. Doç. Dr. Mustafa Yaşar ŞİMŞEK'e,

Yazılımda bana zaman ayıran M.R. Uzel Teknik Lisesi Bilgisayar Bölüm Şefi Kamil KOCALAR'a,

Beni her yönden takdir eden CANIM AİLEM'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### ONAY SAYFASI

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1.Materyal.....	24
3.1.1.Bitki Materyali.....	24
3.1.2.Kimyasallar.....	24
3.1.2.1.Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.....	24
3.1.2.2.Kültür ortamına sonradan ilave edilen büyüme gelişme düzenleyiciler.....	24
3.1.2.3.Antioksidantlar.....	24
3.1.2.4.Sterilantlar.....	25
3.1.2.5.Kültür Kapları.....	25
3.2.Yöntem.....	25
3.2.1.Kültür ortamlarının hazırlanması.....	25
3.2.1.1.MS ortamının hazırlanması.....	25

3.2.1.2.Hormonların hazırlanması .....	26
3.2.1.3.Sterilizasyon .....	26
3.2.2. <i>Nicotiana tabacum</i> cv Samsun'da kallus gelişimi çalışmaları.....	26
3.2.2.1.Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları.....	26
3.2.3. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt döllenmiş embriyolarından somatik embriyogenesis çalışmaları.....	26
3.2.3.1.Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları.....	26
3.2.3.2. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları.....	27
3.2.3.3. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi.....	27
3.2.4. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt meristem kültürü çalışmaları.....	27
3.2.4.1.Meristemlerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları.....	27
3.2.4.2. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt meristemlerinden somatik embriyogenesis çalışmaları.....	28
4.BULGULAR .....	29
4.1. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt döllenmiş embriyolarının somatik embriyogenesis çalışmalarından elde edilen bulgular.....	29
4.2. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt meristemlerinin somatik embriyogenesis çalışmalarından elde edilen bulgular.....	39
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
6.KAYNAKLAR.....	45
EKLER.....	51
BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR.....	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4.1. 2.0mg/lt NAA ve 0.5mg/lt BAP içeren MS ortamında *Nicotiana tabacum* cv Samsun yapraklarından gelişen kalluslar..... 29
- Şekil 4.2. *Nicotiana tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyoları ..... 30
- Şekil 4.3. 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen embriyogenesis ..... 31
- Şekil 4.4. 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen direk somatik embriyogenesis..... 31
- Şekil 4.5. 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen direk somatik embriyogenesis..... 33
- Şekil 4.6. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarında oluşan fenolik birikimi..... 34
- Şekil 4.7. 2002 Temmuz ayında alınan döllenmiş embriyoların embriyogenesis oranları..... 35
- Şekil 4.8. 2002 Temmuz ayında alınan döllenmiş embriyoların direk somatik embriyogenesis oranları..... 36
- Şekil 4.9. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının ½MS+%1 sakkaroz içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler..... 36
- Şekil 4.10. ½MS+%1 sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları..... 37
- Şekil 4.11. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının MS+%3 sakkaroz içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler ..... 37
- Şekil 4.12. MS+%3 sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları..... 38
- Şekil 4.13. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler..... 38
- Şekil 4.14. MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları..... 39



Şekil 4.15. <i>Nicotiana tabacum</i> cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınan <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt tepe meristemleri.....	40
Şekil 4.16. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt uç meristemlerinden oluşan embriyogenesis .....	40
Şekil 4.17. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt uç meristemlerinden oluşan direk somatik embriyogenesis.....	41
Şekil 4.18. <i>Pistacia vera</i> L. cv Siirt tepe meristemlerinin kültürlerinde oluşan kontaminasyon, fenolik ve direk somatik embriyogenesis.....	41



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
ABA	Absisik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Atm.	Atmosfer basınç
BAP	6- Benzil amino pürin
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cv	Kültivar
dH <sub>2</sub> O	Deiyonize su
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
gr	Gram
Ha	Hektar
HPLC	High Performance Liquid Chromotography
IAA	İndol-3- asetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit
Kg	Kilogram
lt	Litre
meq	Mili ekivalens gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	milimetre
M	Molar
MS	Murashige ve Skoog (1962)
NAA	Naftalenasetik asit
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
ppm	Milyonda bir değer
PVP	Polyvinylpyrrolidone
spp.	Cinsine ait türler
sdH <sub>2</sub> O	Steril distile su
vd	ve diğerleri
%	Yüzde

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Ülkemizdeki Antepfıstığı kültür ve yabancı türlerinin bulunduğu bölgeler.....	1
Tablo 1.2. Antepfıstığı'nın bazı sert kabuklu meyve türleri ve sığır eti ile besin değerleri yönünden karşılaştırılması.....	2
Tablo 1.3. Yetişkin bir insanın günlük gıda ihtiyacı ve 100 gr Antepfıstığı'nın bunu karşılama oranı.....	3
Tablo 1.4. Dünya Antepfıstığı üretimi (Ton).....	4
Tablo 1.5. Dünyadaki Antepfıstığı üretim alanları (Ha).....	5
Tablo 1.6. Dünyadaki Antepfıstığı verim miktarları (Kg/Ha).....	5
Tablo 1.7. Dünya kuru meyve üretimi (Ton).....	6
Tablo 1.8. Türkiye'de Antepfıstığı ağacı sayısı ve üretimi (Ton).....	6
Tablo 1.9. Antepfıstığı ihracat değerleri.....	7
Tablo 4.1. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı birinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları.....	30
Tablo 4.2. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı ikinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları.....	32
Tablo 4.3. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı üçüncü haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları.....	33

Tablo 4.4. 2002 yetiştirme d6neminin Temmuz ayı d6rd6nc6 haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları.....	34
Tablo 4.5 2002 yetiştirme d6neminin Temmuz ayı beşinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları.....	35



## 1. GİRİŞ

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin kültüre alınışı çok eskilere dayanmaktadır. İlk olarak Güneydoğu Anadolu'ya yerleşen Etiler tarafından kültüre alındığı, o çağlarda kral sofralarına girdiği, dolayısıyla çok eskilerden beri kültür çeşitlerinin bulunduğu ve meyve değerinin bilindiği belirtilmektedir. Antepfıstığı, miladi I. yy'da Roma'ya, oradan İspanya'ya daha sonra da Fransa'ya yayılmıştır. Fıstığın Amerika'ya geçişi ise, 1853-54 yıllarına rastlamaktadır (Lemaister, 1959).

Antepfıstığı, dünyada kuzey ve güney yarım kürelerinin 30-45 °C paralellerinin uygun iklimlerinde yetişmektedir. Vavilov'a göre (Özbek ve Ayfer, 1959) Antepfıstığı'nın iki gen merkezi vardır;

1-Orta Asya Gen Merkezi: Hindistan'ın Kuzeyi, Afganistan, Tacikistan, Pakistan

2-Yakın Doğu Gen Merkezi: Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan

Ülkemiz Yakın Doğu Gen Merkezi içerisinde yer alır. *Pistacia* cinsi Antepfıstığı adıyla bilinmekte ve bu cinse bağlı 11 tür meyve ağacı ya da süs bitkisi olarak ülkemizde yetiştirilmektedir (Özbek 1978). Ülkemizde Antepfıstığı kültür ve yabani türlerinin bulunduğu bölgeler Tablo 1.1'de verilmiştir (Bilgen 1973).

Tablo 1. 1. Ülkemizdeki Antepfıstığı kültür ve yabani türlerinin bulunduğu bölgeler

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ	AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU EGE BÖLGESİ	GEÇİT BÖLGELER (KUZEY AKDENİZ, ORTA ANADOLU, İÇ EGE)
<i>Pistacia vera</i> L. (Antepfıstığı)	<i>Pistacia vera</i> L. (Az miktarda)	<i>Pistacia vera</i> L. (Az miktarda)
<i>Pistacia terebinthus</i> (Melengiç)	<i>Pistacia terebinthus</i> L.	<i>Pistacia terebinthus</i> L.
<i>Pistacia khinjuk</i> Stocks (Buttum)	-	<i>Pistacia khinjuk</i> Stocks
-	<i>Pistacia mutica</i>	<i>Pistacia mutica</i>
-	<i>Pistacia atlantica</i> Desf (Atlantik Sakızı)	-
-	<i>Pistacia lentiscus</i> (Mezdeki Sakızı)	-
<i>Pistacia palaestina</i> Boiss (Filistin Sakızı)	<i>Pistacia palaestina</i> Boiss (Filistin Sakızı)	-
<i>Pistacia</i> Hibritleri	-	-

*P. vera* L. botanik açıdan;

Alem : Plantae  
Bölüm : Phanerogamae  
Sınıf : Magnoliopsida  
Takım : Sapindales  
Familya : Anacardiaceae  
Cins : Pistacia

olarak sınıflandırılmaktadır.

Meyvelerin kralı, olarak bilinen Antepfıstığı, besleyici özelliği ve lezzeti ile çok önemli bir yere sahiptir. Protein noksanlığının bitkisel üretimle karşılanması, son yıllarda ve özellikle gelişmiş ülkelerde hızla artmaktadır. Antepfıstığı'nın protein, vitamin ve diğer mineral maddeler bakımından zengin oluşu, onu daha da cazip duruma getirmektedir. Antepfıstığı'nın 100 gramının bileşimi, bazı sert kabuklu meyve türleri ve sığır eti ile besin değerinin karşılaştırılması Tablo 1.2'de verilmiştir (Woodroof, 1982).

Tablo 1.2. Antepfıstığı'nın bazı sert kabuklu meyve türleri ve sığır eti ile besin değerleri yönünden karşılaştırılması (100gr. kuru meyvede)

	<b>Antepfıstığı</b>	<b>Badem</b>	<b>Fındık</b>	<b>Ceviz</b>	<b>Sığır eti</b>
Protein (%)	23,5	19,0	12,6	14,8	13,6
Yağ (%)	56,4	54,0	62,4	64,0	41,0
Karbonhidrat (%)	19,0	20,0	16,7	16,8	-
Ca (mg)	131	234	209	99	8
P (mg)	500	504	337	380	124
Fe (mg)	7,3	4,7	3,4	3,1	2,0
Na (mg)	-	4,0	2,0	2,0	65,0
K (mg)	972	773	704	450	355
Vitamin A (mg)	230	0	-	30	80
Vitamin B1 (mg)	0,67	0,24	0,46	0,33	0,06
Vitamin B2 (mg)	-	0,92	-	0,13	0,12
Vitamin B6 (mg)	1,4	3,5	0,9	0,90	3,3
Vitamin C (mg)	30	-	-	2	-
Vitamin E (mg)	5,2	-	-	-	-
Kalori	594	598	634	651	428
Nem (%)	5,3	4,7	5,8	3,5	44,8

Tablo 1.2’de görüldüğü gibi Antepfıstığı meyvesini yoğunlaştırılmış bir enerji hâbi olarak tarif etmek mümkündür. Antepfıstığı, sığır etinden protein yönünden iki kat, fosfor yönünden dört kat üstün olmasının yanında potasyum, demir, A ve B1 vitamini yönünden de oldukça zengindir.

Antepfıstığı’nın yaklaşık %50’si yağdan oluşmaktadır. Bu yağın %90’ı doymamış yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Antepfıstığı üzerinde yapılan tıbbi çalışmalar sonucunda, (günlük düzenli olarak 40-60gr Antepfıstığı tüketen kişilerde): Kötü kolesterolün %24 oranında azaldığı iyi kolesterolün de dengelendiği, doymamış yağ asitlerinin insan vücudunda doygunluk hissi oluşturduğundan, aşırı beslenmeyi engelleyerek fazla kilo sorunlarından kurtardığı, kalp ve damar hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı, Antepfıstığı bünyesinde bulunan fitosterolün, prostat ve göğüs kanserine yakalanma riskini azalttığı, kanser hücre çoğalmasını engellediği, kötü kolesterolün oksitlenmesini engelleyerek kalp hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı, hücre zararını koruduğu tespit edilmiştir. Yetişkin bir insanın günlük gıda ihtiyacı ve 100gr Antepfıstığı’nın bunu karşılama oranı Tablo 1.3’te verilmiştir (Anonim, 2003).

Tablo 1.3. Yetişkin bir insanın günlük gıda ihtiyacı ve 100gr Antepfıstığı’nın bunu karşılama oranı

	<b>Günlük İhtiyaç</b>	<b>Antepfıstığı (100gr)</b>	<b>Karşılama (%)</b>
Kalori (kal)	2900	594	20
Protein (g)	63	22	33
Yağ (%)	60	51	73
Mg (mg)	550	158	28
K (mg)	2000	1020	51
Ca (mg)	800	136	17
P (mg)	800	500	62
Vitamin E (mg)	10	5,2	52
Vitamin B1 (mg)	1,2	0,6	51
Vitamin B6 (mg)	1,4	0,2	14
Vitamin A (IU)	875	230	26

Yetişkin bir insanın günde 100gr Antepfıstığı tükettiğinde, alması gereken günlük gıdanın %35'ini sağlamış olacağı Tablo 1.3'ten anlaşılmaktadır.

Dünyada Antepfıstığı üretimi, özellikle A.B.D.'den kaynaklanan artışlarla son 30 yıl içinde büyük gelişmeler göstermiştir. Dünya Antepfıstığı üretimi Tablo 1.4'de verilmiştir (FAO, 2002).

Tablo 1.4. Dünya Antepfıstığı üretimi (Ton)

ÜLKELER	YILLAR						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Dünya(Top)	393,107	433,094	341,788	510,341	299,411	552,264	321,431
Çin	25,000	28,000	30,000	26,000	29,000	22,000	26,000
Afganistan	2,400	2,500	2,600	4,000	2,800		
Kıbrıs	30	35	32	30	18	18	20
Yunanistan	5,591	8,892	9,137	8,066	6,000	6,500	6,200
İran	238,778	260,085	111,916	313,957	131,166	303,957	120,000
İtalya	2,200	100	5,000	512	2,649	100	1,500
Madagaskar	260	260	270	260	270	160	160
Mauritius	15	5	5	5	5	5	5
Meksika	15	13	52	59	36	31	60
Fas	50	50	60	50	50	50	30
Pakistan	200	200	238	238	194	200	200
Suriye	14,538	24,324	29,428	35,684	30,133	39,923	37,436
Tunus	900	1,000	1,150	1,200	1,300	1,300	1,300
Türkiye	36,000	60,000	70,000	35,000	40,000	65,000	35,000
ABD	67,130	47,630	81,900	85,280	55,790	110,220	90,720



Dünyada yıllara göre Antepfıstığı üretim alanları Tablo 1.5 ve dünyada Antepfıstığı verim miktarları Tablo 1.6'da verilmiştir (FAO, 2002).

Tablo 1.5. Dünyadaki Antepfıstığı üretim alanları (Ha)

ÜLKELER	YILLAR						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Dünya	359,046	383,671	407,819	427,726	426,515	443,095	434,195
Çin	16,600	16,600	17,000	17,500	15,000	12,000	15,000
Afganistan	2,700	2,700	2,700	4,000	3,000		
Kıbrıs	200	220	220	220	190	190	200
Yunanistan	4,900	5,050	5,050	5,100	5,110	5,112	5,110
İran	218,000	231,945	247,130	259,431	256,444	274,728	260,000
İtalya	3,500	4,000	4,000	3,639	3,602	3,600	3,600
Madagaskar	500	500	520	510	520	510	510
Meksika	80	80	81	121	81	85	120
Pakistan	95	95	104	111	118	120	120
Suriye	15,000	18,000	18,000	20,000	19,000	18,500	18,500
Tunus	39,000	43,500	50,000	52,000	56,000	56,000	56,000
Türkiye	34,071	34,981	36,200	37,214	38,340	39,050	40,470
A.B.D.	24,400	26,000	26,814	27,880	29,110	30,200	31,565

Tablo 1.6. Dünyadaki Antepfıstığı verim miktarları (Kg/Ha)

ÜLKELER	YILLAR						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Dünya	10,949	11,288	8,381	11,931	7,020	12,464	7,403
Çin	15,060	16,867	17,697	14,857	19,333	18,333	17,333
Afganistan	8,899	9,259	9,630	10,000	9,333		
Kıbrıs	1,500	1,591	1,455	1,364	947	947	1,000
Yunanistan	11,41	17,608	18,093	15,816	11,742	12,715	12,133
İran	10,953	11,213	4,529	12,102	5,115	11,064	4,615
İtalya	6,286	250	12,500	1,407	7,354	278	4,167
Madagaskar	5,200	5,200	5,192	5,098	5,192	3,137	3,137
Meksika	1,875	1,625	6,420	4,876	4,444	3,647	5,000
Pakistan	21,053	21,053	22,885	21,441	16,441	16,667	16,667
Suriye	9,692	13,513	16,349	17,842	15,859	21,580	20,236
Tunus	231	230	230	231	232	232	232
Türkiye	10,566	17,152	19,337	9,405	10,433	16,645	8,648
A.B.D.	27,512	18,319	30,544	30,588	19,165	36,497	28,741

Antepfıstığı üretiminin dünya kuru meyve üretimindeki payı ve önemi Tablo 1.7’de gösterilmiştir (FAO, 2001). Tablo 1.7’den izleneceği gibi, Antepfıstığı üretimi miktar olarak henüz önemli bir yere sahip değildir.

Tablo 1.7. Dünya kuru meyve üretimi (Ton)

MEYVELER	YILLAR					
	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Fındık	661,902	630,938	615,504	773,228	810,759	788,604
Antepfıstığı	393,107	427,802	335,251	510,341	299,411	552,264
Ceviz	1,040,899	1,067,794	1,111,390	1,133,285	1,195,931	1,182,113
Badem	1,034,781	1,274,993	1,555,390	1,296,420	1,643,930	1,452,465

Ülkemizde Antepfıstığı üretimi Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yoğunlaşmış, son 10 yıl içerisinde özellikle Ege Bölgesi’nde de yaygınlaşmışsa da geniş bir üretim alanı bulamamıştır. Antepfıstığı üretimi yönünden illeri sıraladığımızda (Tablo 1.8), Şanlıurfa’nın birinci sırada olduğu görülmektedir. Bunu Gaziantep, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Siirt illeri takip etmektedir (DİE, 1996).

Tablo 1.8. Türkiye’de Antepfıstığı ağacı sayısı ve üretimi (Ton)

Şehirler	Verimli	Verimsiz	Toplam	Ton Olarak
Şanlıurfa	8.125.210	6.720.450	14.845.660	30.399
Gaziantep	9.162.500	5.676.300	14.838.800	13.844
Adıyaman	3.305.000	2.185.300	5.490.300	4.822
Kahramanmaraş	799.000	616.000	1.415.000	3.680
Siirt	558.700	581.400	1.140.100	1.655
Çanakkale	280.040	59.670	339.710	735
Batman	56.300	118.070	174.370	663
Mardin	156.150	442.846	598.996	564
Manisa	409.211	387.300	796.511	551
İzmir	160.290	152.030	312.320	516
Diyarbakır	83.575	112.325	195.900	464
Aydın	144.180	219.609	363.789	448
Diğer	1.239.844	2.328.700	3.568.544	1.719
TOPLAM	24.480.000	19.600.000	44.080.000	60.060

Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yürütülen bir araştırma projesi sonuçlarına göre Gaziantep ve çevresinde 4 adet Pistacia türü ve bu türlerin 18 farklı çeşidi üretim amacıyla kullanılmaktadır (Kişisel görüşmeler, M. Özaslan).

Güneydoğu Anadolu bölgesinde üretilen fıstıkların ihracatı Gaziantep ilinden gerçekleştirilmektedir. Güneydoğu Anadolu İhracatçı Birlikleri tarafından kayda alınan Antepfıstığı ihracat değerleri Tablo 1.9'da gösterilmiştir.

Tablo 1.9. Antepfıstığı ihracat değerleri

YILLAR	MİKTAR(KG)	DEĞER(\$)
1993	626.000	2.369.000
1994	1.364.000	4.513.000
1995	2.273.000	8.309.000
1996	548.000	2.434.000
1997	2.760.000	11.213.000
1998	625.000	2.944.000
1999	531.000	2.668.000
2000	380.000	1.808.000
2001	3.601.000	12.469.000
2002	1.861.000	7.949.000

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) gerek iç tüketim gerekse dış satımı ile ülke ekonomisine önemli bir girdi sağlayan, Gaziantep ve çevresindeki üreticilerin temel geçim kaynaklarının başında yer alan bir üründür.

Antepfıstığı step iklimini sevmekte olup kireçli, tınlı, çakıllı, taşlı topraklarda ve yamaç arazilerde yetişebilen bir bitkidir. Bu özelliğinden dolayı Antepfıstığı'na kurak verimsiz toprakların, kayalıkların 'Boz altını' adı yakıştırılmaktadır.

Meyvelerinin besin maddelerince zengin içeriğinden dolayı Antepfıstığı, dünya pazarlarında daima aranan bir meyve olmuştur. Ülkemizde yetişen Antepfıstıklarının çoğunlukla yeşil ya da sarı karışımı (gül içi) renkte olması ve damak tadı bakımından daha lezzetli olması, ona belirgin bir üstünlük kazandırmaktadır. Bu yüzden iyi fiyat bulup, üreticiye yüksek gelir getirmektedir.

Antepfıstığı ülkemizde üç şekilde çoğaltılmaktadır. Birincisi, doğada kendiliğinden yetişen ve kültür çeşitlerine anaç olabilecek *Pistacia spp.* aşılması, ikincisi, *Pistacia spp.* tohumlarının ekilmesiyle elde edilen çöğürlerin üretim bahçelerine dikilerek yerinde aşılması, üçüncüsü ise tohumların tüplere ekilmesi ve burada geliştirilerek aşılması sonucunda elde edilen aşılı tüplü fidanların doğrudan bahçeye dikilmesi suretiyle bahçe tesisi yapılmaktadır ( Tekin vd, 2001).

Antepfıstığı dış dölleme gösteren bir bitkidir ve klonal çoğaltma heterozigot olan anaçların üzerine seçkin klonların aşılması ile yapılmaktadır. Anaç ve çelik arasındaki uyumsuzluk sıkça ara-aşı (inter-grafting) gerektirir. Klasik pratiklerden sadece tohum ekilerek çöğür elde edimi ve bunun üzerine aşılama yöntemi ile çoğaltılan Antepfıstığı'nda, köklenme problemi olduğu için çelik ya da daldırma ile üretim sağlanamamaktadır. Çöğürlerin üzerine yapılan aşılama çalışmalarında da, sakızlanmadan dolayı aşılama başarısının düşük olması, anaç-kalem arasındaki uyumsuzluk gibi problemler bulunmaktadır. Diğer bir çok meyve türünde olduğu gibi Antepfıstığı'nda da, tohumdan çöğür elde edimi ve bunların plantasyonu oluşturması, istenmeyen bir durumdur. Çünkü, bu şekilde generatif üretim ile tohumlarda meydana gelecek açılmalar sonucu bahçelerde standardizasyon olmayacaktır. Ayrıca dioik bir bitki olduğu için meydana gelecek yeni bireyin erkek olma olasılığı vardır ve bu durum yeni bitkinin çiçeklenme dönemine kadar (8-10 yıl) anlaşılacaktır. Dolayısıyla bu tip bitkiler bahçelerde gereksiz yer işgal edecektir. Bu nedenle mikro çoğaltım (meristem kültürü, somatik embriyogenesis) ile seçkin Antepfıstığı varyetelerinin klonlanarak çoğaltılması mevcut problemlere çözüm getirebilecektir. Bununla birlikte Antepfıstığı, sert kabuklu meyveler gurubu içerisinde çoğaltılması en zor olan türdür (Joley, 1979).

Bu çalışmada, odunsu bitkilerin çoğaltılmasında önemli bir sorun olan fenolik birikimlerinin engellenmesinde 'nurse culture' tekniğinin etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca önemli bir çeşit olan *P. vera* L. cv Siirt'in meristem ve embriyo kültürleri ile mikroçoğaltım olanakları araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Modern ıslah metodları olarak belirtilen tekniklerden birisi olan doku kültürleri, organogenesis ve somatik embriyogenesis gibi yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması hem zaman ve hem de uzun dönemde uygulandığı takdirde yapılacak masraflar açısından büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu vd, 2001).

Doku kültüründe somatik embriyogenesis birçok bitki türünün hızlı klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlı miktardaki materyale bağlı olan çelikle çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktadır. Özellikle, birçok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa bir sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır (Parrot vd, 1993).

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar (Parrot vd, 1993).

Somatik embriyogenesis yağ palmyesini de içine alan bazı bitki türlerinde ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yağ palmyesi tohumla çoğaltılmakta olup, bitkiler yüksek oranda heterozigot olduğundan dolayı elde edilen döllerde büyük varyasyon

gözlenmektedir. Ayrıca, bu bitkinin tek bir meristemi bulunmakta ve çelikle klonal çoğaltımı da mümkün olmamaktadır. Ivory sahillerinde 1983'ten sonraki 10 yıllık sürede somatik embriyolardan elde edilen bitkilerden 280 hektarlık yağ palmyesi plantasyonu kurulmuştur. Bu bitkilerin bazılarının çiçek yapılarında anormallikler gözlenmiş olsa bile, yağ oranı bakımından önemli bir homojenite sağlamışlardır (Parrot vd, 1993).

Somatik embriyo kültürleri, bitkilerin hızlı çoğalması yanında diğer bazı önemli özellikleri de taşımaktadırlar. Somatik embriyogenesis sonucunda oluşan ürün bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun bir benzeridir. Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme programına da sahiptirler. Bu yüzden, somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Parrot vd, 1993).

Bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle iyileştirilmesinde doku kültürü yöntemlerine mutlak bir ihtiyaç vardır. Doku kültürü çalışmalarında çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen birçok besin ortamı formülasyonu mevcut olmasına rağmen MS (Murashige ve Skoog, 1962 ), B5 (Gamborg vd, 1968), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) ve bunların çeşitli modifikasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd, 2001).

MS ortamı tütün için geliştirilmiş ve yüksek tuz içerikli bir ortamdır. Özellikle düşük yoğunluklarda (¼, ½) birçok bitki türündeki köklendirme çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır. Bitki besin ortamlarında yer alan komponentler kullanım sıklığına göre sırasıyla; su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, şekerler (karbon kaynağı), yarı katılaştırıcılar (jel yapıcılar; agar, agaroz vb.), bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar ve aminoasitler yanında kimyasal olarak tanımlanamayanlardan oluşmaktadır. George, (1993); Franklin ve Dixon, (1994); Gamborg ve Phillips, (1995). Bu komponentlerin hepsi aynı anda her ortamda bulunmayabilir.

Temel besin ortamı içindeki en önemli makro elementlerden birisi azottur. MS ortamında yüksek oranda, değişik formlarda ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  veya organik) azot bulunmaktadır.  $\text{KNO}_3$  formunda azot ilavesi aynı zamanda potasyumunda ortama

ilavesini sağlar Franklin ve Dixon, (1994). Diğer makro elementler arasında ise fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt ve kalsiyum sayılabilir.

En çok kullanılan mikro elementler sırasıyla demir, manganez, çinko, bor, bakır, molibden, kobalt ve iyot'tur (Gamborg ve Philliips, 1995).

Vitaminler, enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptirler. Bitki kültürleri için en gerekli vitaminler tiamin (B1) ve daha sonra sırasıyla nikotinik asit (B3, niasin) ve pridoksin (B6)'dir. Myo-inositol ve d-biotin(H) de öncelikle gerekli vitaminler arasında yer almaktadır (George, 1993).

Şekerler, besin ortamının en önemli komponentlerindedir. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından (yani heterotrof olduklarından) enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmalıdır. Bunlar arasında en fazla kullanılanı sakkaroz'dur. Besin ortamlarında sıklıkla kullanılan diğer şekerler sırasıyla glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktoz'dur (George, 1993).

Jel yapıcı maddeler besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek için kullanılan komponentler arasındadır. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden çıkarılan çeşitli polisakkarit bileşimlerdir. En çok kullanılanlar; agar (değişik tipleri), agaroz, sea-krem agaroz, aljinat, phytigel (gelrite), silikajel, jelatin ve nişasta'dır (George, 1993).

Bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan, bitkisel hormonlar ya da fitohormonlardır. Söz konusu maddeler bitkilerde çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve bitki metabolizmasında önemli görevler üstlenmektedirler. Yapıları bitkilerde bulunan doğal hormonlara benzeyen sentetik düzenleyiciler üretilebilmekte ve hormon isminin elde edilen maddeleri tam tanımlamamasından hareketle bunlara büyüme ve gelişme düzenleyiciler (BGD) denmektedir. George, (1993). Doğal BGD'ler, oksinler, sitokininler, gibberellinler, dorminler (absisik asit) ve etilen grubu olarak belirtilmektedir.

Oksinler; fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidir. Oksinler, doku kültüründe tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA (Indole-3-asetic acid)'tir. Sentetik oksinler ise NAA ( $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid), IBA (İndole-3-butyric acid), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), Picloram, 2,4,5-T (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) ve olarak belirtilmektedir (Smith, 1992).

Doğal sitokinin formları zeatin (ZEA) ve zeatin ribozid (ZR)'dir. 2IP (İzopentil adenin), K (kinetin), BAP (6-Benzil amino pürin) en çok kullanılan adenin (aminopurin) türevleridir. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup (Smith, 1992), antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler.

Mekanik yaralanma gibi stres durumları ortaya çıktığında, bitki dokularında fenolik bileşiklerin metabolizması uyarılmaktadır. Eksplantların kesim yüzeyinden çıkan fenolik bileşiklerin oksidasyonu bazı bitki türlerinin kültüründe ciddi bir sorundur. Bu durum besin ortamının kararmasına ve dokularda toksik etkiye yol açarak, eksplantların gelişme ve farklılaşma yeteneklerini ciddi olarak sınırlandırmaktadır. Kararma sorunu daha çok odunsu türlerden alınan olgun dokularda yaygındır. Bu toksik bileşiklerin bitkiler tarafından engellenmesi oldukça zordur. George ve Sherrington, (1984)'a göre ortam ve dokuların kararmasını engellemek için alınması gereken önlemler şunlardır; i) fenolik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması (aktif karbon veya polyvinylpyrrollidone, gibi fenolik adsorbantlar aracılığı ile), ii) redoks potansiyelinin azaltılması ve iii) fenolaz enziminin inaktive edilmesi (Debergh ve Read, 1993).

Askorbik asit ve sitrik asit gibi fenolik oksidasyonu engelleyici antioksidantların kullanımı, karanlıkta kültür ve sıvı ortam gibi uygulamalar, toksik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında genellikle başarılı olmamaktadır. Besin ortamındaki toksik bileşikleri yok etmenin en etkin ve kolay yolu aktif karbon kullanmaktır. Ancak aktif



karbon toksik bileşiklerle birlikte ortamdaki oksin ve sitokin gibi organik bileşikler ile diğer bir çok bileşiği de adsorbe etmektedir. Bir çok açıdan PVP (Polyvinylpyrrolidone) toksik bileşiklerin adsorbsiyonunda başarılı sonuçlar vermektedir (Pierik, 1988).

Doku kültürü çalışmalarında fenolik oluşumu ve fenolik engeli için birçok araştırma yapılmıştır. *Saccharum officinarum*'da bitkinin yaş ve kuru ağırlığı numaralandırılmış, filizlerin kültür ortamlarında fenolik atımları gözlenmiştir. Numaralı filizlerde ilk 20 gün içinde %82 oranında gallik asit oluşmuş, fenolik yoğunluğunun sistein ve paklobutrozol kullanılarak önüne geçildiği bildirilmiştir. Sistein kültür ortamlarındaki fenolik artışını azaltmış, fakat yaş ağırlıkta olanlarda etkili olmamıştır. Paklobutrozol oranını yükseltmek fenolik atımı ve şeker kamışı filiz oluşumuna neden olmuştur. Sonuç olarak; filiz oluşumu ile fenolik atımı arasındaki ilişkinin bitkinin ağırlık toplamıyla ilgili olmadığı bildirilmiştir (Lorenzo vd, 2001).

*Pinus sylvestris*'te olgun goncalardan kallus oluşturulmuş, enzimatik aktivite esnasında kahverengileşme ve hücresel yapının değiştiği gözlenmiştir. Işık (LM), elektron (EM), scanning (SEM) elektron mikroskopta hücresel yapının değişiklikleri ve fenolikler işaretlenmiştir. Kallusun büyüme oranı ölçüldüğünde, kültür periyodunun başlamasından ikinci ve üçüncü haftası arasında peroksidaz aktivitesinde hızla artma, bu arada hücre zarında incelme ve kahverengileşme ile klorofil kaybı ve hücrenin ölümü gözlenmiştir. Sonuç olarak olgun çamlardan doku kültürü yapmanın zor olduğu bildirilmiştir (Laukkanen vd, 2000).

*Vitis vinifera* cv Chardonnay ve Merlot'da stilben toplamının çevresel ve gelişimsel etkileri araştırılmış ve bu amaçla, seralarda büyüyen filizler alınarak HPLC yöntemi ile stilben phytoalexin sentezi ekstrakte edilip çiçeklerin fenolik bileşimleri tayin edilmiştir. Çiçeklerin fenolik komponentlerinin Quercetin'den türediği, Chardonnay'da ölçülebilir stilbenin trans-Resveratrol olduğu belirtilmiştir. Bir süre sonra 7 stilbenik bileşim olduğu, fenolik ve stilbenlerin oluşumunun yapraklarda azaldığı gözlenmiştir. Genç kallusların resveretrol, piceid, epsilonviniferin ve belirlenemeyen stilbenler oluşturduğu, yaşlı kalluslarda bu yeteneğin kaybolduğu saptanmıştır. Bütün stilbenlerin aynı zamanda ortaya çıktığı piceid sentezinden, resveretrol novo sentezinin glikozitleşmesinden önce kallusun kahverengileştiği,

epsilonviniferin sentezinin ortaya çıkması ile hücrelerin kısa dalga boyunda (UV) zarar görmesine neden olduğu da bildirilmiştir (Keller vd, 1998).

*Camellia sinensis*, kallus kültürlerinde fenolik birikimi ile kloroplast oluşumu arasındaki ilişki araştırılmış, kalluslar sürekli ve 16 saat ışıklandırma ile mukayese edilmiştir. Kalluslar bir bölgeden sürekli ışıklandırıldığında fenolik bileşiklerin arttığı, kallusların 16 saat ışıklandırılmaları ile bunların oluşumlarının üst bölgede incelendiği, başlıca fotomiksotropik (ışıktan faydalanabilen küçük boylu ağaçlar, çalılar vb.) çay kalluslarının gelişiminde fenolik birikiminin kloroplast gelişimiyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Zagoskina vd, 2000).

*Catharanthus roseus*'un hücre süspansiyon kültürlerinde indol alkaloidler ve fenollerin birikimi ile triptofan dekarboksilaz ve phenylalanine ammonia-lyase elde edilişi çalışmasında, kültür ortamlarındaki phenylalanine ammonia-lyase enziminin derecesi fenollerin sentezine neden olduğunu göstermiştir. İndol alkaloidlerin oluşumunda önce triptofan dekarboksilazdan geçerek triptamin oluşturduğu ve sonuç olarak sentezlerinin birbiriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Seitz vd, 1989).

*Prunus avium*'da Ca eksikliği ve prunin sentezi araştırılmış, MS ortamına 1492M Ca ya da sadece %5 (75M) Ca ilavesiyle karanlıkta kallus oluşturulmuş, düşük Ca oranında yağ asitleri sentezi ve membran lipidlerinin değiştiği görülmüştür. Unsature yağ asitleri 18:3 lipidler bir süre sonra azalmış phosphatidylethanolamine toplandığı görülmüştür. Düşük Ca ortamında prunin (naringenin -7-glucoside) ve eriodictyol -7-glucoside oranı kalluslarda yükselmiştir. *In vitro*'da küçük filizlerin büyümesiyle prunin oluşumu fenoliklerin üst kısımda birikimine neden olmuştur. Prunin oluşumu kallus kültürlerinde elektrolitlerin artışına ve 18:3 yağ asitlerinin azalmasına neden olmuştur (Yuri vd, 1990).

*Nicotiana tabacum* doku kültürlerinde fenoliklerin artışı ve hücre bölünmesine etkisi araştırılmış, eksojen stokininlerin eksikliğinde tütünün stokinin gerektiren dokularının büyümesini arttırmak için Dehydrodiconiferyl alcoholglucosides (DCGs) den türemiş phenylpropanoidlerin gerekli olduğu saptanmıştır. *N. tabacum* hücre bölünmesinde sentetik DCG hücre bölünmesini başlatmış, izomer A ve B pekiştirmiştir. Sonuç olarak DCG birikimi ve stokininle muamelenin hücre bölünmesine neden olduğu belirlenmiştir (Teutonico vd, 1991).

*Petunia hybrida* hücre süspansiyonlarının lignin sentezi ve antosiyanin düzenlemesinde, 30gr glikoz ve 2.0mg/lt NAA ilavesiyle oluşturulan MS ortamında orthovanadate toplamı lignin birikimine sebep olmuştur. Orthovanadate hücre büyümesinde negatif sonuç verip, Phenylalanineammonialyase (PAL) aktivitesini arttırmıştır. NAA konsantrasyonunu 2.0mg/lt'den, 1.0mg/lt'ye düşürmenin lignin ya da antosiyaninlerin üretiminde daha fazla artışa neden olduğu bildirilmiştir (Hagendoorn vd, 1991).

*Parthenium argentatum* filiz eksplantları MS ortamına 0.1mg/lt 2,4-D+0.1mg/lt kinetin ve 0.2mg/lt NAA ilavesiyle oluşturulan kültürlerde 2 gün sonra ışık mikroskobu ile incelenen hücrelerde tanımlanamayan osmiophilic globüller biriktiği ve hücre sayısında azalma olduğu, kalan hücrelerin varlığını sürdürebildiği bildirilmiştir. Spektrofotometri, HPLC ve tranmission elektron mikroskobu hücrelerdeki fenolikleri göstermiştir (Trautmann vd, 1991).

*Pimpinella major in vitro* kültürlerinde phenylpropanoidlerin birikimi ve oluşumunda karşılaştırmalı araştırma yapılmıştır. %1 Difco agar ile katılaştırılan ve 1.0mg/lt kinetin+7.0mg/lt NAA ve 30gr sakkaroz ilavesiyle kurulan MS ortamında oluşturulan anorganize kalluslar 6 ay sonra incelenmiştir. Sıvı MS ortamında büyüme regülatörleri olmadan kallus kültürlerinden yaprak-kök farklılaşması gerçekleştirilmiştir. Kalluslarda biriken epoxypseudo isoeugenol tiglitate (EPT), epoxy-anol tiglitate (EAT) ve anol tiglitate (AT) tüm bitki ve fidelerle karşılaştırılmıştır. Anorganize kallus kültürlerinde hiç phenylpropanoidler toplanmazken yaprak kök farklılaşması olan kültürlerde EPT toplanmıştır. Ayrılan ve kök içerenlerden sırasıyla 360g ve 1000g EPT/g FW belirlenmiştir. Fenil propanoidlerin dağılımı bitkide organlara göre değişmektedir. EPT oranı meyvelerde 0, köklerde 107mg/g FW belirlenmiştir. EAT ve AT meyvelerde 7.0mg/g ve 5.3mg/g FW dir. Fidelerdeki EPT konsantrasyonlarında 0.4–0.7, 0.8–1.0 ve 0.5–0.6mg/g FW olarak belirlenmiştir (Merkel vd, 1990).

İnsan sağlığında analjezik olarak kullanılan ve bazı antibakteriyel özellikleri olan fenil propanoid glikozitler *Tecoma sambucifolium* doku kültürlerinde üretilmiştir. Kallus hücre hatları kullanılmıştır. 2,4-D ve kinetin içeren ortamda yüksek oranda üretilmişlerdir. Düşük oranda sitokin içeren ortamda bu bileşiklerin oranında azalma saptanmıştır (Pletsch vd, 1993).

Yara çıkarmak, infeksiyon gibi stres olaylarında bitkide hücre duvarında fenil propanoidler toplanmaktadır. Hücre duvarı fenolik bileşimleri (cinnomoyl esterleri kapsamakta, 2-phenylethanol, vanilin ve 4 hydroxybenzaldehyde) *Petroselinum crispum* hücre kültürlerinde hastalığa direnç olarak sentezlendiği gösterilmiştir (Matern vd, 1994).

*Salix myrsinifolia* bitkiciklerinden alınan eksplantlar farklı sakkaroz, nitrojen ve pH ortamlarında bitki artışı ve ikinci derecede fenoliklerin gözlenmesi için 7 hafta kültüre alınmıştır. MS hormon içermeyen katı ortamda 4 sakkaroz miktarı, 6 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ve 3 pH denemesi kurulmuştur. %3 sakkaroz bitki artışı ve phenolic glucoside artışına neden olmuştur. %6 sakkaroz'da bitki artışı, phenolic glucoside artışını geçmiştir. Ortamda NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> miktarını ½ oranında değiştirmek bitki üretimini azaltmış, 1/8, 1/32 oran phenolic glucoside miktarını çok artırmıştır. Bitki artışı ve phenolic glucoside üretimi pH 5.7'de yükselmiştir. Sonuç olarak ilk metabolitlerin üretimi çok ince bir balans (büyüme, bakım, depo) ikinci metabolitler üretiminin dış enerjiye bağlı olduğu karbon kaynaklarının bölünmesiyle ikincil fenoliklerin elde edileceği bildirilmiştir (Julkunen vd, 1996).

*N. tabacum* cv. Xanthi doku kültürlerinde pektinaz veya pronaz ile hücre duvarını yıkan enzim uygulaması yapılmış fenil propanoid ve tyramin metabolizması teşvik edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadan amaç hücre duvarına bağlı olarak bulunan fenolik polimerler ile tyramin'in hidroksisinnamik asit amidleri sentezi arasındaki ilişkinin belirlenmesi olmuştur. Pektinaz uygulaması fenilalaninammoniyaz, 4 kumarat CoA ligaz, tyramin hidroksisinnamotil transferaz ve peroksidaz aktivitelerinde bir artışın meydana gelmesini sağlamıştır. Ayrıca bu polimerlerin birikimi ile birlikte 4 kumarat CoA ligaz, hidroksisinnamotransferaz ve peroksidaz aktivitelerinde artış belirlenmiştir (Negrel vd, 1995).

*Salvia officinalis* fidelerinin nodal segmentlerinden alınan eksplantların 4 farklı sitokinin ilavesiyle oluşturulan *in vitro* kültürlerinde fenolik antioksidantların birikimi gözlenmiştir. MS ortamına 1.5mg/lt BAP ve 0.05mg/lt 2,4-D ilavesiyle oluşturulan kültürlerde düşük miktarda antioksidantlar gözlenmiştir. 0.05mg/lt 2,4-D filizlendirme ve büyümede önemli bir etki yapmamış, canlı kütle ve fenolik antioksidantların üretimine etki etmiştir. Filizlerden 17 antioksidan bileşik tanımlanmıştır. Fenolik asitler gibi; gallik asit, 3-O-kafeoilkuinik asit, 5-O-kafe-

oilkuinik asit, kafeik asit ve rozmarinik asit, flovonoidler gibi; hesperetin, apigenin, hispidulin, sirsimaritin ve genkvanin, fenolik diterpenler gibi; epirosmanol, epirosmanol metil eter, karnosol, episorosmanol etil eter, rozmadial, karnosik asit ve metil karnosate. Karnosik asit ve metil karnosate hariç diğer 15 fenolik bileşik kâr amaçlı türlerdir. Başlıca ekstrakte edilen antioksidant fenolik bileşikler rozmarinik asit ve karnosol'dur. Sonuç olarak kinetin oranını azaltmak karnosol diterpen fenolik artışına neden olmaktadır (Santos vd, 2002).

*Trapa japonica* Flerov'un *in vitro* organogenesis çalışmasında, eksplantlardan sızan fenoliklerin kallus evresinde büyümeye olumsuz etki ettiği saptanmıştır. Kotiledonlardan kallus elde etme çalışmasında MS ortamına (katı,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ) 2,4-D ya da BA ilavesi fenolik birikimini azaltmaktadır. Toplam kallus oluşumunu phloroglucinol (PG) artırmaktadır. Askorbik asit fenolik birikimini azaltmakta fakat (PG)'dan daha düşük sonuç vermektedir. Yarı katı MS ortamına 2.7M 2,4-D, 108.0M kazein hidrolizat ve 10.8M (PG) ilavesi maksimum oranda kallus oluşturmaktadır. Bitki organogenesisinde vitaminler de (0.27M Biotin ve 2.7M follik asit) artışa neden olmaktadır. Yarı katı MS ortamında 0.27M BA ilavesi filiz gelişiminde olumlu etki yapmıştır. Eksplantlar sıvı, yarı katı MS ortamına 1.08M BA ve 0.27M NAA ilavesiyle filizlendirilmiş ve sıvı, yarı katı MS ortamına 5.4M IBA ilavesi ile köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkiler plastik kaplara transfer edilip, 3 hafta sonra transfer edilen bitkilerin %100 oranında hayatta kaldıkları görülmüştür (Hoque vd, 2002).

*Solanum tuberosum*'un ışıkla antosiyanin ve flavonid biyosentezi çalışmasında, *in vitro*'da flovonoidler ve fenolik asit minimum 8 saat sonra ortaya çıktığı, maksimum 10 gün sonra da yüksek oranda antosiyanin sentezlendiği saptanmıştır. Işıklandırmanın antosiyanin ve flavonoid üretimini artırdığı düşük oranda ışıklandırmada ise yumruların açıldığı görülmüştür. Antosiyanin üretimi önce kök sonra yumru ve sonra da tomurcuk oluşumunu sonlandırmıştır. Bu sonuçla bileşimlerin var olma nedeni ışıkla ortaya çıkmakta ve yumrulara taşınmakta, patates kültürleri arasında aşılamanın ise antosiyanin sentezi için kararlı anaçlar oluşturduğu rapor edilmiştir (Lewis vd, 1998).

*Pistacia* türlerinde bitki doku kültürleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. *Pistacia vera* L. ve bu türün iki kültür çeşidi olan 'ohadi' ve 'kalleghochi' çeşitlerinde tohumların aseptik koşullarda çimlendirilmesinden elde edilen yaklaşık 10 günlük çok genç aseptik çöğürleri ya da bunların *in vivo* koşullara alınmış 1-2 yaşlı çöğürlerini kullanarak MS ortamında 1.5-2.0cm uzunluğunda sürgünler elde edilip köklendirilerek sera koşullarına aldıklarını bildirmişlerdir (Barghchi ve Alderson, 1983).

Her 9-10 günde bir ( $26 \pm 1$  °C) de alt kültüre alınan *P. vera* L. mezokarp dokusunun MS ortamında 2mg/lt NAA+4mg/lt 2,4-D+2mg/lt kinetin'e ek olarak 3mg/lt 2,4-D+2mg/lt kinetin ile çok sayıda gri beyaz renkli nodüllerin 70-80 gün içerisinde meydana geldiği rapor edilmiştir (Ahmad vd, 1989).

*P. vera*'nın genç ve olgun ağaçlarından alınan embriyoların doku kültüründe çoğalma ve köklenmenin başarıldığı bildirilmiştir (Gonzalez ve Frutos, 1990).

*P. atlantica* Desf. anaçlarının apikal ve aksillar tomurcuklarından elde edilen eksplantların kalsiyum ortamında 0.0 ve 13.6meq/lt seviyesinde iyi sonuçların alındığını 1.70meq/lt'nin yüksek konsantrasyon olduğunu ve yaralı filizlerin oluştuğu rapor edilmiştir (Mederos vd, 1991).

*Pistacia vera* L. apikal tomurcuk ve yumrularından MS ortamında 4.0mg/lt Kinetin ve 1.0mg/lt NAA eklenerek filizlenmenin gerçekleştiği, filizlerin hormonsuz MS ortamında köklendiği bildirilmiştir (Yücel vd, 1991).

*P. vera* ve melez (*P. atlantica* x *P. integerrima*) uygun bir büyüme ortamı sağlanarak sürgün gelişiminin DKW (Driver ve kuniyuki, 1984) ortamında, K, N, B ve Zn konsantrasyonları optimum büyüme koşullarına uygulandığı Thidiazuron (10-9/10-5M) büyüme regülatörlerinin test edildiği fakat başarılı olmadığı, ilk denemede bakteriyel bulaşıklığın olduğu, %2'lik CO<sub>2</sub> ortamında bulaşıklığın kontrol edildiği ve fotosentez seviyesini artırdığı bütün karbon kaynaklarının (şekerler) elendiği, bu sistemin sakkarozlu ortamlarla karşılaştırıldığında yeni bir ortama uyma, köklenme, hayatta kalma, büyüme ve gelişme yönünden iyi sonuç verdiği, IBA 1.2x10<sup>-5</sup>>M içeren ortamlarda %88'den fazla köklenme elde edildiği, düşük IBA içeriğinin sonuç vermediği rapor edilmiştir (Parfitt vd, 1994).

*P. vera* sürgün ucu yara simptomlarını hafifletme ve *in vitro* yetiştirilmesinde bor ya da kalsiyum her ikisi de standart MS ortamına ilave edildiğinde sürgün ucu karamasının sürekli olarak problem yarattığı, her iki kültür ortamına 100-1000M bor ya da kalsiyum glukonat (0.3-30mM) gelişmeyi önemli derecede azalttığı fakat sürgün ucu karamasını önlemediği, pratik solüsyonla önlediği, 4 yıllık ağaçlardan elde edilen filizlerin her 7 günde bir sıvı MS ortamına 15mM kalsiyum glukonat ilavesinin sürgün ucu karamasını tamamen önlediği bildirilmiştir (Abousalim vd, 1994).

*P. vera*'nın *in vitro* üremesi (sürgün ucu, tomurcuk vb.) bitki büyüme regülatörleri ile WPM-Woody Plant Medium (Lloyd ve McCown, 1980), B5 (Gamborg vd, 1998), G (George, 1993) ortamlarına filiz ve tomurcuklar kültüre alındığında, MS ortamına 0.5mg/lt BA+0.1mg/lt IBA ilavesiyle diğer ortamlardan daha iyi oluşum sağlandığını G ortamına 0.5mg/lt BA+0.1mg/lt IBA ilavesiyle (0.71cm) filizlerde uzama sağlandığı, MS ortamında IBA ve NAA'in büyük ölçüde filiz oluşumunu hızlandırdığı, bir süre NAA'de iyi filizlendirme verdiği fakat IAA ile ortamda sürgün ucu karaması meydana geldiği rapor edilmiştir. IBA ya da NAA ile köklü bitkiler elde edildiği ve başarılı bir şekilde seralara yerleştirildiği de bildirilmiştir (Yang vd, 1994).

*In vitro*'da meyve ağaçlarının köklerini *Agrobacterium rhizogenes* ve poliaminlerin içeriği ile üretim çalışmasında poliaminlerin (PAs) elmada düşük badem ve pistacia köklerinde ise sonuç vermediği, *A. rhizogenes*'in oksinsiz ortamda sadece zeytinde köklenmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Rugini, 1992).

*P. vera* L. tohumlarının sıvı MS ortamına 2, 4, 6, 8 ya da 10mg/lt BA ekleyerek filizlendirildiği *P. atlantica* tohumlarının da katılaştırılmış MS ortamına 0.5, 1, 2, 4 ya da 8mg/lt BA ekleyerek filizlendirildiği, *P. vera*'da yüksek oranda sürgün oluşumu sağlandığı ortama 6-8mg/lt BA eklenince 14 gün sonra %80-100 oranında, 35 gün sonra ise bütün kültürlerde sürgün oluştuğu (*P. atlantica*'da 1-2mg/lt BA ile %83) oranında filizlenme gerçekleştiği 4mg/lt'den yüksek konsantrasyonun filizlenmeyi önemli ölçüde azalttığı, 1mg/lt BA ile oldukça gelişmiş sürgünler ve tomurcuklar oluştuğu rapor edilmiştir (Abousalim, 1991).

*P. vera* L. kotiledon eksplantlarından 2.5-5mg/lt 2,4-D içeren sıvı MS ortamında büyük tek hücrelerin üretildiği NAA, BA ve 2IP (her birinden 1.5mg/lt) içeren ortamda da küresel küçük sayısız globüler hücrelerin elde edildiği bazı kültürlerde kalp ve torpil biçimli yapılarında görüldüğü rapor edilmiştir (Ahmad vd, 1992).

*P. vera* L. kotiledon eksplantlarından MS ortamı, WPM (Woody Plant Medium, Lloyd & Mc Cown, 1980) ve SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972) ortamlarında nicelik ve nitelik olarak farklı kallus şekilleri oluştuğu, WPM ortamında MS ortamından iki kat kallus kümesi oluştuğu (beyazdan koyu kahveye bağımsız nodüller), çalışmalarda makro ve mikro besinleri ortamda değiştirince kahverengi kallus kümeleri oluştuğu (MS ve WPM'deki değişiklik SH ortamından fazla kallus oluşturduğu) rapor edilmiştir (Jabeen vd, 1995).

Sıvı MS ortamına %6 sakkaroz ve bitki büyüme regülatörleri ile %2-4 sakkaroz ve BA, ABA'nın (0,5mg/lt) *P. vera* L. somatik embriyolarının olgunlaşma gösterdiği, sırasıyla ABA ve BA (0.59'dan 0.33 ve 0.50'den 0.26) farklı filizlenme olasılıkları tespit edildiği 2mg/lt ABA ile yüksek oranda filizlenme (0.62) gerçekleştiği rapor edilmiştir (Onay vd, 1997).

*P. vera*'nın *in vitro* sürgün ucu kararmasını engelleme çalışmasında, kalsiyum (3-24mM) ve bor (100-800M) kullanılarak sürgün ucu kararması önemli ölçüde azaltılmıştır. Bununla beraber sürgün gelişimide azalmıştır. Kalsiyum ve bor eksikliği meristematik büyümeyi engellemekte 24mM'a kadar kalsiyum ve kalsiyum klorid gibi maddeler kullanmanın sürgün ucu kararmasını kontrol altına aldığını rapor etmişlerdir (Barghchi vd, 1995).

*P. vera* cv olgun kotiledon eksplantlarından MS ortamına 10mg/lt 2,4-D ilavesiyle kallus üretimi sağlandığı 7 hafta sonunda 2 tip kallus oluştuğu (yumru ve tanecikli) ilk oluşan kallusların embriyolar ürettiği, sonrakilerinde embriyonik kaliteyi kültürlerde kolaylaştırdığını bildirmişlerdir (Abousalim vd, 1994).

*P. vera* L. dormant tomurcukların köklendirme çalışmasında MS ortamına 2mg/lt IBA ve 1mg/lt tiamin ile kök gelişiminin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Chatibi vd, 1995).



*Pistacia* spp., *P. mutica* ve *P. terebinthus* nodal segmentlerden alınan eksplantların 5mg/lt BAP ilave edilen MS ortamında filizlendirildiği, filizlenme için BAP'ın esansiyel olduğu, *P. mutica*'nın hızlı büyüdüğü, *P. vera*'nın ise daha da büyük gelişme gösterdiği sonradan ortaya çıkan aksillar tomurcukların oluştuğu, kök oluşumu için de 5mg/lt IBA kullanıldığı rapor edilmiştir (Sheibani vd, 1994).

Sera şartlarında büyüyen fidelerin (*P.terebinthus*, *P. atlantica* ve *P. khinjuk*) ile Kırmızı, Siirt ve Ohadi çeşitlerinin anaçlarının GA<sub>3</sub> (0,250 ya da 500ppm) muamelesinde, 7 ay sonra filizlerin çaplarında önemli ölçüde büyüme (>7mm) kaydedildiği GA<sub>3</sub> ile sürekli muamelenin sonuç vermediği, 18 ay sonra Ohadi ve Siirt çeşitlerinde önemli ölçüde artış olduğu bildirilmiştir (Nikpeyma vd,1994).

*P. vera* L. olgunlaşmamış meyvelerinden kalsiyum alginat ile somatik embriyolar ve tohumlar üretildiği uygun koruma ile istenilen seçkin genotiplerin elde edilebileceği bildirilmiştir (Onay vd, 1996).

*P. vera* L'nin filizlendirilmesinde 5M BA ve 0,05M IBA, 0,3, 1, veya 3.2M metil jasmonat (Meja) eklenen MS ortamında sürgün gelişiminde önemli oranda artış olduğu, filizlerin kök formunda sıcaklıkla oksin arasında önemli etkileşim olduğu NAA'in 25°C de IAA ve IBA'den farkının yüksek olduğu, 28°C de oksinler arasında fark olmadığı meja ve uygun oksinle muamele 31.6M NAA 25°C de ve 31,6M IAA 28°C de filizlerin kök form oranını artırdığı, kök uzunluğunu azalttığı, 1M Meja ve 31.6M NAA 25°C de %80 den fazla filizlenmeye neden olduğu Meja'nın kök oluşumunu sağladığı ve bunların yeni bir ortama transfer edildiği rapor edilmiştir (Dolcet vd, 1995).

*P. vera* L olgunlaşmamış meyvelerinden alınan eksplantlar sıvı MS ortamına 200mg/lt kasein hidrolizat, 114M Askorbik asit ilavesiyle oluşturulduğu 2 hafta sonra embriyojenik kütlelerin 8.9M BA içeren sıvı MS ortamına alındığı ve yeniden 4.4M BA içeren sıvı MS ortamına transfer edilerek birkaç evrede kültürlerde embriyogenesis gözlemlendiği, oluşan somatik embriyoların embriyojenik kütlelerden kolayca ayrılarak çimlendirilmek üzere hormonsuz MS ortamına aktarıldığı rapor edilmiştir (Onay vd, 1995).

*P. vera*'da yaprak eksplantlarından oluşturulan embriyojenik kümeden sıvı MS ortamında farklı BAP, ABA ve sakkaroz konsantrasyonları denenerek somatik embriyogenesis oluşumu sağlanmıştır. 4 sakkaroz konsantrasyonu (58,117,175 ve 234mM), 5 BAP konsantrasyonu (4.5-7.1M), 4 ABA konsantrasyonu (0.95-7.6M) belirlenerek 4, 5 ve 6. haftalarda kültürlerde artan süre ile doğru orantılı olarak filizlenme gerçekleştiği gözlenmiştir. Filizlenmede BAP ve ABA konsantrasyonlarının etkili olduğu sakkarozun düşük oranda etkili olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak BAP'in somatik embriyogenesis oluşumunda gerekli olduğu rapor edilmiştir (Onay vd, 2000a).

*P. vera* ağaçlarının olgun nodulleri MS ortamına (8.8M) BAP ilavesiyle filizlendirildiği 30 gün sonra eksplantlarda filizlenme artışı gerçekleştiği köklenme için MS ortamına (9.8M) IBA ilave edilip köklenmenin başarıldığı ve köklenen bitkilerin seralara transfer edildiği rapor edilmiştir (Onay, 2000b).

*P. vera cv* Antep, yaprak eksplantlarından elde edilen embriyojenik kütlelerin somatik embriyo dokularını mikroskopta inceleme çalışmasında, alınan kesit hematoksilin-eozin ile boyanarak mikroskopta incelendiğinde başlangıçta 2 tip hücrenin bir araya gelerek farklılaşmasıyla yaprak eksplantlarından somatik embriyo oluştuğu bunların üst epidermal ya da alt epidermal hücreler olduğu rapor edilmiştir (Onay, 2000c).

*P. atlantica*'da olgun meyvelerden sıvı MS ortamında embriyojenik küme oluşturmak için 100mg/lt kazein hidrolizat, 100mg/lt L-askorbik asit ilave edildiği, oluşan embriyojenik kütlelerin ayrılıp 3 hafta için 0.5-4mg/lt BAP içeren ortama alındığı, transfer edilen embriyojenik kütlede somatik embriyo oluştuğu, somatik embriyoların agarla katılaştırılmış MS ortamında olgunlaştırıldığı, olgunlaşan somatik embriyoların büyüme regülatörleri olmayan ortamda filizlendirildiği rapor edilmiştir (Onay, 2000d).

*P. vera L.* olgun kotiledonlarının kültüründe büyüme regülatörlerinin etkisi çalışmasında, MS ortamına BAP, IBA ve NAA sırasıyla (0-2mg/lt) ilavesi ve 69 muamele sonrası kotiledonların yanıtının çok değişken olmadığı, büyüme regülatörlerinin sonuçlarını anlamının teorik olarak zor olduğunu, yüksek oranda

sonuç alınmasında BAP tesadüfi iken IBA ve NAA'nın daha ılımlı etki yaptığı rapor edilmiştir (Chatibi vd, 1998a).

*P. vera* somatik embriyogenesis çalışmasında kotiledonlardan elde etmek için 1.0mg/lt 2,4-D+1mg/lt kinetin (%60), yapraklardan elde etmek için 2.0mg/lt 2,4-D+1,5mg/lt kinetin (%63), internodlardan elde etmek için 5.0mg/lt 2,4-D+2.0mg/lt kinetin'in (%68) ortama ilave edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Chatibi vd, 1998b).

*P. mutica* ve *P. vera*'nın filiz geliştirme ve filiz tipi nekrozlarının kontrolü çalışmasında, filiz gelişimi ile oluşan sürgün ucu kararmasının kontrolü için, MS ortamına 100M IBA ilavesi ile filizlenen eksplantların köklendiği (%99 RH) su buharıyla doyumunun sürgün ucu kararmasını önemli ölçüde azalttığı bunun da filiz uzunluğunun önemli derecede artmasına neden olduğu, (*P. mutica*'da 1.92'den 3.6mm'ye, *P.vera*'da 3.2'den 6.04mm'ye kadar) elektron mikroskopunda yaprak yüzeyleri ve stomatal yapı incelendiğinde büyümenin kültürde daha az geliştiği serada da benzer karakteristik özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Ghoraishi vd, 1998).

*P. vera* olgun kotiledonlarından bitki üretimi ve filizlendirilmesinde büyüme regülatörlerinin etkileri çalışmasında, 69 farklı kombinasyon denendiği ve en iyi kombinasyonun 1.5:1.0:1.0 ve 1.5:2.0:0.5mg/lt (BA:IBA:NAA) olduğu, bu ortamda filizlenen kotiledonların kolaylıkla köklendiği ve yeni bir iklime uyduğu rapor edilmiştir (Chatibi vd, 1997).

Gelişmemiş *Pistacia* tohumlarından Kerman çeşidinde embriyo oluşturmak amacı ile farklı ortamlar denenmiş, bu amaçla büyüme regülatörlerinin olmadığı katı MS ortamı, sakkaroz ve büyüme regülatörlerinin olmadığı yarı katı MS ortamı, büyüme regülatörlerinin olmadığı sıvı MS ortamları denenmiştir. Bütün ortamlarda filizlenmenin gerçekleştiği 4 hafta sonra filizlenen fidelerin aynı alt kültüre alındığı, en iyi köklenmenin büyüme regülatörlerinin olmadığı sıvı MS ortamında gerçekleştiği rapor edilmiştir (Büyükalaca vd, 1996).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1. Bitki materyali**

Araştırma materyalini oluşturan bitkiler, *Pistacia vera* L. cv Siirt, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Gen Kaynağı bahçesinden, *Nicotiana tabacum* cv Samsun Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Kimyasallar**

Ortamların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Sigma, Merck ve Calbiochem firmalarından satın alınmıştır.

###### **3.1.2.1. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar**

Bütün çalışmalarda MS (Murashige ve Skoog, 1962) doku kültürü ortamı kullanılmıştır. Bu ortamın içerdiği kimyasallar ve bu kimyasalların kullanılan miktarları Ek1'de verilmiştir.

###### **3.1.2.2. Kültür ortamına sonradan ilave edilen büyüme gelişme düzenleyiciler**

Eksplantlarda regenerasyonun sağlanması için oksinlerden NAA (Naphthaleneacetic acid); sitokinlerden BAP (6-Benzylamino purine) kullanılmıştır.

###### **3.1.2.3. Antioksidantlar**

Kültür aşamasında eksplantlarda meydana gelebilecek kahverengileşmeyi önlemek amacıyla aktif kömür (Activated Charcoal) kullanılmıştır.

#### **3.1.2.4. Sterilantlar**

Ekspantların sterilizasyonunda %70'lik etil alkol, ticari sodyumhipoklorit (%46 aktif madde) ve surfaktan olarak Tween-20 kullanılmıştır.

#### **3.1.2.5. Kültür kapları**

Kültür aşamasında 9 ve 14 cm'lik cam petri kapları, köklendirme için de 2.5x20 cm'lik cam tüpler kullanılmıştır.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Kültür ortamlarının hazırlanması**

Bu çalışmada, besi ortamlarının hazırlanması, sterilizasyonu ve *in vitro* kültürler Can vd, (1992a); Can vd, (1992b) ve Koç vd, (1992) tarafından belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır.

##### **3.2.1.1. MS ortamının hazırlanması**

Ek.2'de verilen oranlarda A.B.D. stok solüsyon grubundaki kimyasallar tartılmış ve dH<sub>2</sub>O çözülerek, üzerleri 100 ml'ye tamamlanmıştır. Stok C'nin hazırlanmasında ise FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O belirtilen oranda tartılmış ve 90 ml dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Bu çözelti karıştırılarak ısıtılmış ve açık sarı berrak bir solüsyon haline getirilmiştir. Daha sonra Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O (Titriplex) ilave edilmiş, çözeltinin tamamı dH<sub>2</sub>O ile 100ml'ye tamamlanmış ve pH 5.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonlar belirli aralıklar ile kontrol edilmiş ve herhangi bir mikrobiyal bulaşıklık saptandığında yeniden hazırlanmıştır. 1 lt kültür ortamının hazırlanması için stok solüsyonlardan 10'ar ml ve Ek.3'de verilen kimyasallardan (agar hariç) belirtilen oranlarda tartılıp alınarak çözelti dH<sub>2</sub>O ile 1lt'ye tamamlanmıştır. pH 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak 5.7'ye ayarlanmıştır. Son olarak 8gr/lt agar ilave edilmiştir.

### **3.2.1.2. Hormonların hazırlanması**

Hormonlar stoklar halinde hazırlanmıştır. Kullanılan oranda tartılan hormonlar 1M NaOH ile çözülerek dH<sub>2</sub>O ile istenilen miktara tamamlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. MS ortamına pH ayarlanmadan önce eklenmiştir.

### **3.2.1.3. Sterilizasyon**

Ortamlar 1 atm. basınçta 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

## **3.2.2. *Nicotiana tabacum* cv Samsun'da kallus gelişimi çalışmaları**

### **3.2.2.1. Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları**

*N. tabacum* cv. Samsun yaprakları önce yüzey sterilizasyonunun sağlanması için tween-20 içeren deterjanlı suda 5 dakika çalkalanarak yıkanmış ve daha sonra steril kabin içerisine alınmışlardır. %70'lik alkolle 1 dakika muamele edilip sdH<sub>2</sub>O dan geçirilen yapraklar %70'lik etanole daldırıp çıkarılarak 3 kez daha sdH<sub>2</sub>O'dan geçirilmiştir. Sterilizasyonu yapılan yapraklar filtre kağıtlarında kurutularak 1cm büyüklüğünde kesilmiş ve 2.0mg/lt NAA+0.5mg/lt BAP ilavesiyle hazırlanan MS ortamında kültüre alınmış ve kallus oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır. Kültürler 25±2°C sıcaklık ve 4.000 lüx ışıklandırmada 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullarına sahip klima odalarına yerleştirilerek kallus oluşumları 2-3 hafta sonra gözlenmiştir.

### **3.2.3. *Pistacia vera* L. cv Siirt döllenmiş embriyolarından somatik embriyogenesis çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları**

*P. vera* L. cv Siirt 25 yaşındaki genç ağaçlardan alınan örnekler çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra Tween-20 içeren deterjanlı su ile 5 dakika çalkalanarak yıkanan örnekler steril kabin içerisine alınmışlardır. %70'lik alkolde 5 dakika ve %10'luk NaOCl'te 15 dakika bekletilerek 3 kez sdH<sub>2</sub>O'dan geçirilen örnekler filtre kağıtlarına alınarak kurumaya bırakılmışlardır. Makasla kesilip pensle çıkarılan embriyolar fenolik birikiminin engellenmesi için *Nicotiana tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınmış ve embriyogenesis oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır. Kültürler 25±2°C sıcaklık ve 4.000 lüx ışıklandırmada 16 saat ışık, 8

saat karanlık koşullarına sahip klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 4-6 hafta sonra yapılmıştır.

### **3.2.3.2. *İn vitro*'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları**

2002 Temmuz ayı boyunca haftada 2 kez alınan embriyolar MS ortamına 2mg/lt NAA ve 0.5mg/lt BAP ilavesi ile geliştirilen *N. tabacum* cv Samsun kallusları üzerine, daha sonra 1 ve 2'şer hafta arayla 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamına aktarılmış ve aktarılan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır.

### **3.2.3.3. *İn vitro*'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi.**

Embriyogenesis meydana gelmiş ve sürgün oluşturmuş eksplantları köklendirme amacı ile A, B, C olarak adlandırılan üç farklı ortam kullanılmıştır. A ortamı, ½MS+%1 sakkaroz; B ortamı, MS +%3 sakkaroz; C ortamı, MS+ %1 charcoal (aktif kömür) içeriği ile hazırlanarak içinde 25ml ortam bulunan tüpler içerisine bu sürgünler yerleştirilmiştir.

### **3.2.4. *Pistacia vera* L. cv Siirt meristem kültürü çalışmaları**

#### **3.2.4.1. Meristemlerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları**

Meristem kültürü çalışmaları *P. vera* L. cv Siirt üzerinde yapılmış ve bu amaçla 2003 Ocak ayında 25 yaşındaki ağaçların 2 yıllık genç sürgünlerinden alınan tepe ve yan tomurcukları kullanılmıştır. Tomurcuklar önce Tween-20 içeren deterjanlı suda 15 dakika süre ile yıkanarak kaba temizliği yapılmış ve steril kabin içerisine alınmışlardır. %70'lik alkolde 2 dakika bekletilmiş ve sdH<sub>2</sub>O'dan geçirilip daha sonra %15'lik NaOCl'te 15 dakika süre ile bekletilip 2 kez sdH<sub>2</sub>O dan geçirilmiştir. Bu aşamalardan sonra doku üzerinden 2 yaprak primordiası çıkarılarak %5'lik NaOCl içerisinde 5 dakika bekletilmiş 2 kez sdH<sub>2</sub>O'dan geçirilmiştir. 5 yaprak primordiası daha çıkarılarak tepe ve yan tomurcuklardan alınan yaklaşık 2-3mm boyundaki meristemler %70'lik alkole sadece daldırılıp çıkarılmış ve 3 kez daha sdH<sub>2</sub>O'dan geçirilerek steril filtre kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır. 2-3 dakika sonra filtre kağıtlarından alınarak *N. tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınmış ve somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır.

Kültürler  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve 4.000 lüx ışıklandırmada 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullarına sahip klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 4-8 hafta sonra yapılmıştır.

#### **3.2.4.2. *Pistacia vera* L. cv Siirt meristemlerinden somatik embriyogenesis çalışmaları**

2003 Ocak ayında 25 yaşındaki ağaçların 2 yıllık genç sürgünlerin tepe ve yan tomurcuklarından elde edilen meristemler MS ortamına 2mg/lt NAA ve 0.5mg/lt BAP ilavesi ile geliştirilen *N. tabacum* cv Samsun kallusları üzerine, daha sonra 1 ve 2'şer hafta arayla 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamına aktarılmış ve aktarılan meristemlerden embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır.

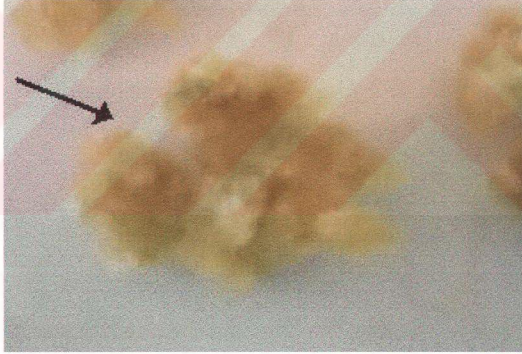




## 4. BULGULAR

### 4.1. *Pistacia vera* L. cv Siirt döllenmiş embriyolarının somatik embriyogenesis çalışmalarından elde edilen bulgular

*Pistacia* spp. eksplantlarının kesim yüzeyinden çıkan fenolik bileşikler, doku kültürlerinde besi ortamlarının kararmasına ve dokularda toksik etkiye yol açarak gelişme ve farklılaşma yeteneklerinin sonlanmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada ‘nurse culture’ tekniği uygulanarak, eksplantlardan sızan fenoliklerin emilimi önemli ölçüde azalmıştır. Nurse culture tekniği için *N. tabacum* cv Samsun yapraklarından MS ortamına 2.0mg/lit NAA ve 0.5mg/lit BAP ilavesiyle kalluslar geliştirilmiş (Şekil 4.1), *Pistacia vera* L. cv Siirt döllenmiş embriyoları kalluslar üzerinde kültüre alınmışlardır.



Şekil 4.1. 2.0mg/lit NAA ve 0.5mg/lit BAP içeren MS ortamında *Nicotiana tabacum* cv Samsun yapraklarından gelişen kalluslar

Temmuz ayı boyunca haftada iki kez alınan (1. hafta:A1, A2; 2. hafta:B1, B2; 3. hafta:C1, C2; 4. hafta:D1, D2 ve 5. hafta:E1 olarak adlandırılmıştır.) döllenmiş embriyolar belirli sürelerde kalluslar üzerinde kültüre alınmış (Şekil 4.2), daha sonra 4.0 mg/lt BAP ilavesiyle hazırlanan MS ortamına aktarılmıştır.



Şekil 4.2. *Nicotiana tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyoları

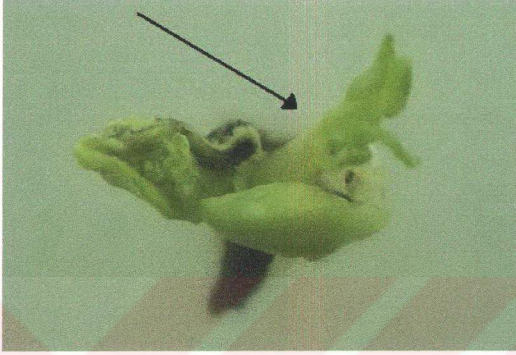
Temmuz ayının ilk haftasında alınan embriyoların embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı birinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları

EMBRIYO ALIM DÖNEMİ	MS ORTAMINA AKTARMA	EMBRIYO-GENESIS %	DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS %	FENOLİK BİRİKİMİ (*)
02.07.2002 A1	08.07.2002	45,5	-	-
	23.07.2002	-	42,8	-
05.07.2002 A2	16.07.2002	30,3	-	+
	29.07.2002	-	16,6	+

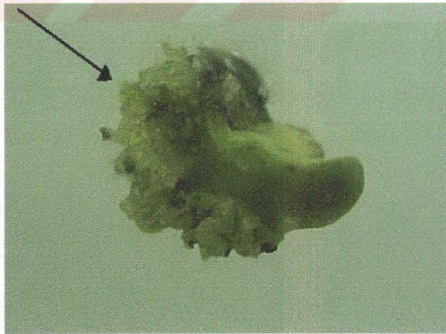
(\*) + : Var, -- : Yok

02.07.2002 tarihinde *N. tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınan (A1) ve 08.07.2002 tarihinde 4.0mg/lit BAP ilavesiyle hazırlanan MS ortamına aktarılan 11 canlı embriyodan 5'inde embriyogenesis oluşmuş ve %45,5 oranında başarı sağlamıştır. (Şekil 4.3) kültürlerde fenolik gözlenmemiştir.



Şekil 4.3. 4.0mg/lit BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen embriyogenesis

02.07.2002 tarihinde *N.tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınan ve 23.07.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan (A1) 7 canlı embriyodan 3'ünde direk somatik embriyogenesis oluşmuş (Şekil 4.4) ve %42,8 oranında başarı sağlanmıştır.



Şekil 4.4. 4.0mg/lit BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen direk somatik embriyogenesis

05.07.2002 tarihinde alınıp (A2) 16.07.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 33 canlı embriyodan 10 embriyogenesis, 3 direk somatik embriyogenesis oluşmuş %30,3 oranında başarı sağlanmıştır. 20 embriyoda fenolik birikimi gözlenmiştir. 05.07.2002 tarihinden 29.07.2002 tarihine kadar *N. tabacum* cv Samsun kalluslarına bırakılan (A2) 6 canlı embriyodan 1 direk somatik embriyogenesis oluşmuş ve %16,6 oranında başarı sağlanmıştır.

Temmuz ayının ikinci haftasında alınan embriyoların embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

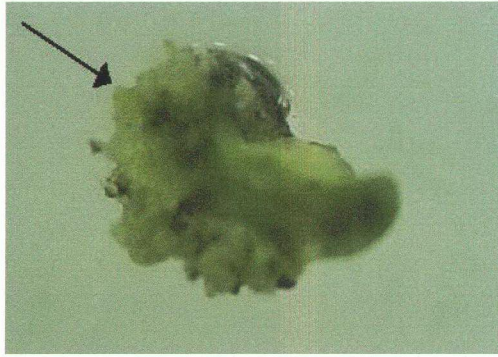
Tablo 4.2. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı ikinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları

EMBRIYO ALIM DÖNEMİ	MS ORTAMINA AKTARMA	EMBRIYO-GENESIS %	DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS %	FENOLİK BİRİKİMİ (*)
09.07.2002 B1	19.07.2002	1,6	-	+
	30.07.2002	-	9,09	+
12.07.2002 B2	23.07.2002	17,1	-	+
	29.07.2002	-	100	+

(\*) + : Var, -- : Yok

09.07.2002 tarihinde alınan embriyolar (B1) 19.7.2002 tarihine kadar *N.tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde kültüre alınmıştır. 64 canlı embriyodan 1 direk somatik embriyogenesis oluşturulmuştur. 56 embriyoda fenolik birikimi gözlenmiş ve %1,6 oranında başarı sağlanmıştır. 09.07.2002 de (B1) alınan ve 30.7.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 11 canlı embriyodan kök gelişimi gözlenmiş, 1 embriyoda direk somatik embriyogenesis sağlanmış ve oran %9,09 olmuştur.

12.07.2002 tarihinde kalluslar üzerinde kültüre alınan (B2) ve 23.7.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 41 canlı embriyodan 7 embriyogenesis oluşmuş ve % 17,1 oranında başarı sağlanmıştır. 39 embriyoda fenolik birikimi gözlenmiştir. 12.07.2002 tarihinde alınıp 29.07.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 3 canlı embriyonun tümünde direk somatik embriyogenesis oluşmuş (Şekil 4.5) %100 oranında başarı sağlanmıştır.



Şekil 4.5. 4.0mg/lt BAP içeren MS ortamında *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarından gelişen direk somatik embriyogenesis

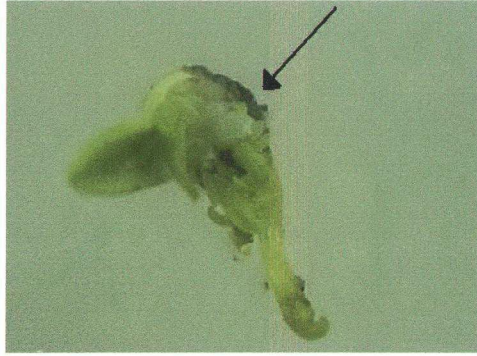
Temmuz ayının üçüncü haftasında alınan embriyoların embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı üçüncü haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları

EMBRIYO ALIM DÖNEMİ	MS ORTAMINA AKTARMA	EMBRIYO-GENESIS %	ĐİREK SOMATİK EMBRİYOGENESIS %	FENOLİK BİRİKİMİ (*)
16.07.2002 C1	26.07.2002	6,4	-	+
	05.08.2002	-	-	+
19.07.2002 C2	30.07.2002	100	-	+
	12.08.2002	-	-	+

(\*) + : Var, -- : Yok

16.07.2002 tarihinde alınıp (C1) 26.07.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 73 canlı embriyodan 5'inde embriyogenesis oluşmuş %6,4 oranında başarı sağlanmıştır. 72 embriyoda fenolik birikimi gözlenmiştir. 16.07.2002 de alınıp 05.08.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 20 canlı embriyoda fenolik birikiminden dolayı embriyogenesis gözlenmemiştir. 19.07.2002 tarihinde alınıp (C2) 30.7.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 8 embriyoda da embriyogenesis gözlenmiş, başarı %100 oranında gerçekleşmiştir. Kültürlerde fenolik birikimi gözlenmiştir (Şekil 4.6.). 19.07.2002 tarihinde alınıp (C2) 12.08.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 1 canlı embriyoda embriyogenesis gözlenmemiştir.



Şekil 4.6. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarında oluşan fenolik birikimi

2002 Temmuz ayı dördüncü haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı dördüncü haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları

EMBRIYO ALIM DÖNEMİ	MS ORTAMINA AKTARMA	EMBRIYO-GENESIS %	DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS %	FENOLİK BİRİKİMİ (*)
23.07.2002 D1	30.07.2002	-	-	+
	14.08.2002	-	4	+
26.07.2002 D2	30.07.2002	-	-	+
	14.08.2002	-	-	+

(\*) + : Var, -- : Yok

23.07.2002 ve 26.07.2002 tarihlerinde alınan (D1, D2) embriyolarda fenolik birikimi embriyolardan yüksek oranda sonuçların alınmamasına neden olmuştur. 23.07.2002 tarihinde kalluslar üzerinde kültüre alınıp (D1) 14.08.2002 tarihinde MS ortamına aktarılan 25 canlı embriyodan 1 direk somatik embriyogenesis gerçekleşmiş ve başarı %4 oranında olmuştur.

Temmuz ayının beşinci haftasında alınan embriyoların embriyogenesis ve direk embriyogenesis sonuçları Tablo 4.5. de verilmiştir.

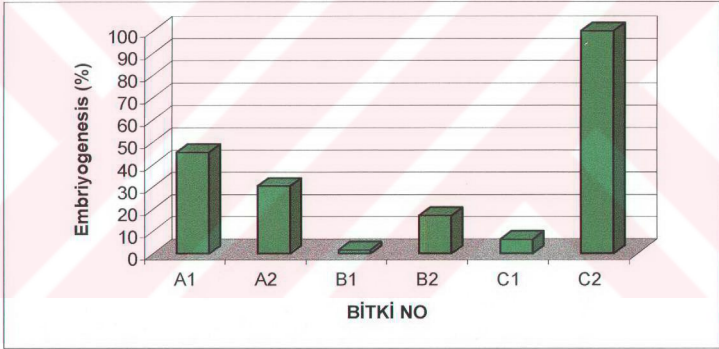
Tablo 4.5. 2002 yetiştirme döneminin Temmuz ayı beşinci haftasında alınan embriyolardan embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis sonuçları

EMBRIYO ALIM DÖNEMİ	MS ORTAMINA AKTARMA	EMBRIYO-GENESIS %	DİREK SOMATİK EMBRİYOGENESİS %	FENOLİK BİRİKİMİ (*)
29.07.2002 E1	12.08.2002	-	-	+
	26.09.2002	-	-	+

(\*) + : Var, -- : Yok

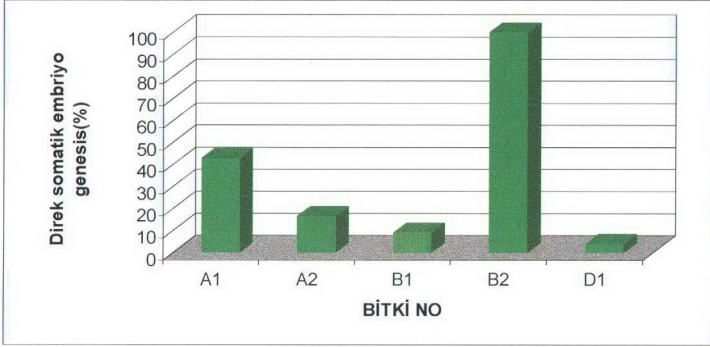
29.07.2002 tarihinde alınan (E1) embriyolarda fenolik birikimleri engellenememiş ve embriyoların gelişmemesine neden olmuştur.

Temmuz ayında alınan embriyoların embriyogenesis oranları Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekil 4.7. de görüldüğü gibi embriyogenesis Temmuz ayının ilk üç haftasında gerçekleşmiştir. En yüksek oran ise üçüncü haftada gözlemiştir.



Şekil 4.7. 2002 Temmuz ayında alınan döllenmiş embriyoların embriyogenesis oranları

Temmuz ayında alınan embriyoların direk embriyogenesis oranları Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi direk somatik embriyogenesis Temmuz ayının ikinci haftasında en yüksek oranda gözlenmiştir.



Şekil 4.8. 2002 Temmuz ayında alınan döllenmiş embriyoların direk somatik embriyogenesis oranları.

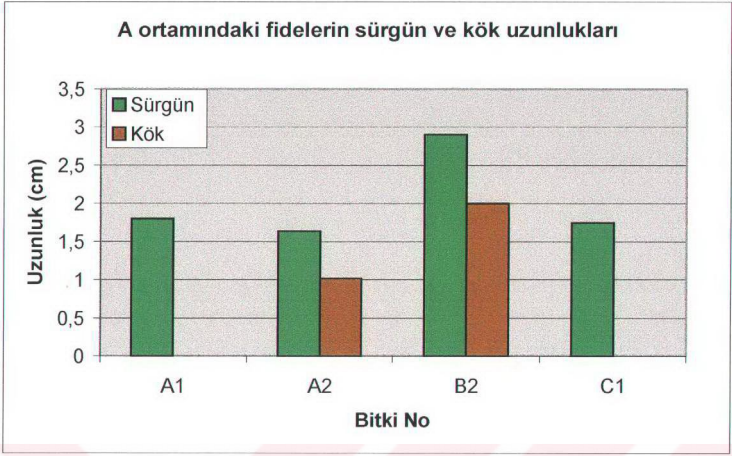
Elde edilen sürgünler, 04.09.2002 tarihinde hormon içermeyen A, B, C ortamlarında kültüre alınarak kök gelişimleri sağlanmıştır.

A ortamı,  $\frac{1}{2}$ MS+%1 sakkaroz ilavesiyle hazırlanmış, geliştirilen kök ve sürgünler Şekil 4.9'da, fidelerin kök ve sürgün uzunlukları ise Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının  $\frac{1}{2}$ MS+%1 sakkaroz içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler



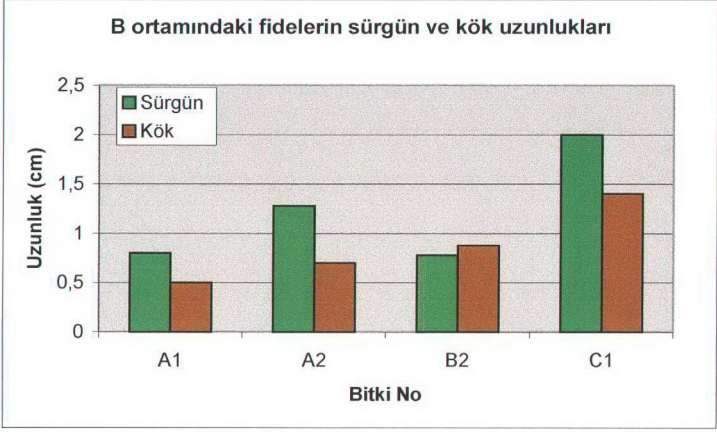


Şekil 4.10.  $\frac{1}{2}$ MS+%1 sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları

B ortamı MS+%3 sakkaroz ilavesiyle hazırlanmış, geliştirilen kök ve sürgünler Şekil 4.11’de, fidelerin kök ve sürgün uzunlukları ise Şekil 4.12’de verilmiştir.

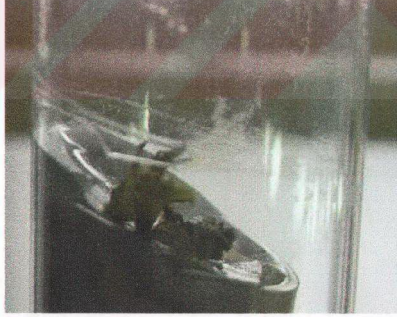


Şekil 4.11. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının MS+%3 sakkaroz içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler

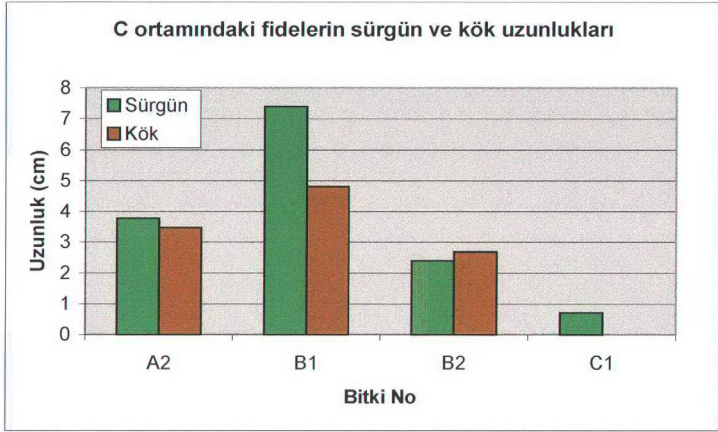


Şekil 4.12. MS+%3 sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları

C ortamı MS+%3 sakkaroz+%1 charcoal ilavesiyle hazırlanmış, geliştirilen kök ve sürgünler Şekil 4.13'de, fidelerin kök ve sürgün uzunlukları ise Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13. *Pistacia vera* L. cv Siirt embriyolarının MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür içeren ortamda oluşturduğu kök ve sürgünler



Şekil 4.14. MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür içeren ortamda kültüre alınan *Pistacia vera* L. cv Siirt fidelerinin kök ve sürgün uzunlukları

A , B , C köklendirme ortamlarından sonuç alınmış, özellikle C ortamında sürgün ve kök gelişiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre sürgün ve kök gelişimi için en uygun ortam C ortamı olarak saptanmıştır.

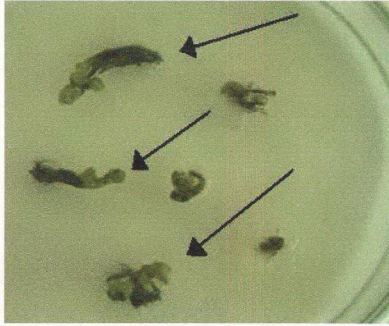
#### 4.2. *Pistacia vera* L. cv Siirt meristemlerinin somatik embriyogenesis çalışmalarından elde edilen bulgular

*Pistacia vera* L. cv Siirt 25 yıllık ağacın 2 yıllık genç sürgünlerinin tepe (apikal) ve yan (axillar) meristemleri MS ortamına 2.0 mg/lt NAA ve 0.5mg/lt BAP ilavesi ile oluşturulan *N. tabacum* cv Samsun kallusları üzerinde 02.01.2003 tarihinde kültüre alınmış (Şekil 4.15) ve ikişer hafta kültürde bekletilerek alt kültüre alınmıştır.

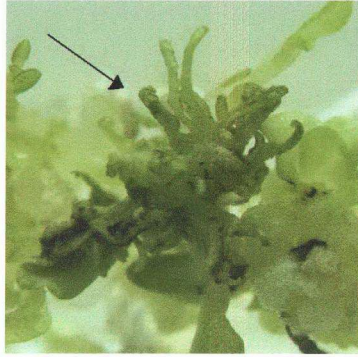


Şekil 4.15. *Nicotiana tabacum* cv Samsun yapraklarından geliştirilen kalluslar üzerinde kültüre alınan *Pistacia vera* L cv Siirt tepe meristemleri

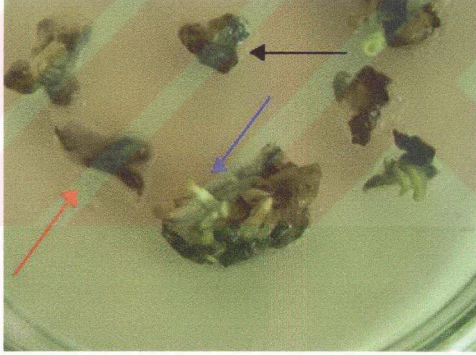
20 adet yan meristem, 40 adet tepe meristem kültüre alınmış ve 25.02.2003 tarihinde embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis oluşmaya başlamıştır. Kültürlerde fenolik birikimleri ve mikrobiyal kontaminasyon gözlenmiştir. Embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis oluşumu başlayan meristemler 4.0mg/l BAP ilavesi ile hazırlanan MS ortamına 06.03.2003 tarihinde aktarılmıştır. Yan meristemlerin kültür ortamlarındaki kontaminasyon ve fenolik birikimleri engellenememiştir. Alınan 40 adet tepe meristeminin 16'sında fenolik 4'ünde kontaminasyon meydana gelmiş 20 meristemde embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis gözlenmiştir. *Pistacia vera* L. cv Siirt uç meristemlerinden oluşan embriyogenesis Şekil 4.16'da, direk somatik embriyogenesis Şekil 4.17'de ve kültürlerde oluşan kontaminasyon, fenolik ve direk somatik embriyogenesis Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.16. *Pistacia vera* L. cv Siirt uç meristemlerinden oluşan embriyogenesis



Şekil 4.17. *Pistacia vera* L. cv Siirt uç meristemlerinden oluşan direk somatik embriyogenesis



Şekil 4.18. *Pistacia vera* L. cv Siirt tepe meristemlerinin kültürlerinde oluşan kontaminasyon (■), fenolik (■) ve direk somatik embriyogenesis (■)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Heterozigotik yapısı nedeniyle Antepfıstığı üretiminde sadece vegetatif çoğaltma yöntemleri önem kazanmaktadır. Köklenme zorlukları nedeniyle çelik ve daldırma gibi vegetatif çoğaltma yöntemlerinin kullanılmaması farklı aşı tekniklerini ön plana çıkarmıştır. Ancak bu yöntemin yavaş ve pahalı olması yeterli sayıda çoğaltım materyali eldesini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle Antepfıstığı anaç ve çeşitlerinin yoğun klonal çoğaltımında doku kültürlerinin kullanılma olanakları araştırılmaktadır. Doku kültürleri, Antepfıstığı gibi çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde bitki hücrelerinin totipotens özelliğinden faydalanılarak somatik embriyogenesis yoluyla tek bir hücreden tüm bitki elde edilmesi işleminde rutin olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte Antepfıstığı'nda bulunan fenolik bileşikler doku kültürü tekniklerinin uygulanabilirliğini negatif yönde etkilemektedir. Fenolik bileşikler bitkilerde stres, infeksiyon ve travma gibi durumlarda doğal olarak salgılanmakta, doku kültürlerinde ise bitki eksplantlarına toksik etki ederek doku ölümlerine neden olmaktadır.

İnfeksiyon gibi stres olaylarında bitki hücre duvarında fenil propanoidlerin toplandığı *P. crispum*'da bu bileşiklerin hastalığa direnç olarak sentezlendiği Matern vd, (1994) tarafından rapor edilmiştir.

Lorenzo vd, (2001) yapılan bir çalışmada doku kültürlerinde fenolik bileşikleri engellemek amacı ile sistein ve paklobutrozol kullanılarak *S. Officinarum*'da filizlendirme sağlandığı bildirilmiştir.

Abousalim, (1991) tarafından yapılan bir çalışmada, MS ortamına 1.0mg/lt BA ilavesiyle *P. vera* tohumlarından %80-100 oranında sürgünlerin elde edildiği bildirilmiştir.

Onay, (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ise *P. vera* olgunlaşmamış meyvelerinden alınan eksplantların MS ortamına 200mg/lt kazein hidrolizat ve 111M askorbik asit ilavesiyle somatik embriyogenesis oluştuğu bildirilmiştir. *P. vera*' da

somatik embriyogenesis için BAP'in gerekli olduğu Onay, (2000) tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmada ilk kez 'nurse culture' tekniği kullanılarak *P. vera* L. cv Siirt'in döllenmiş embriyoları ve sürgünlerinden alınan meristemler *N. tabacum* cv Samsun yapraklarından geliştirilen kalluslar üzerinde kültüre alınmış ve fenolik bileşikler önemli oranda engellenmiştir. Daha sonra MS ortamına 4.0mg/lt BAP ilavesi ile somatik embriyogenesis oluşumu sağlanmış ve Onay, (2000) çalışması ile paralellik göstermiştir. 2002 yetiştirme döneminde alınan *P. vera* L. cv Siirt döllenmiş embriyolarından Temmuz ayı ikinci haftasında %100 oranında direk somatik embriyogenesis, üçüncü haftasında da %100 oranında embriyogenesis oluşumu sağlanmıştır. İlk üç hafta önemli oranda embriyogenesis oluşumuna karşılık, dördüncü ve beşinci haftada alınan embriyolardan embriyogenesis oluşturulmamıştır. Bu olayın embriyonun ontogenetik ve fizyolojik yaşı, eksplantın bitkiden alındığı dönem, embriyonun büyüme programının tamamlanması gibi sebeplere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yüksek oranda embriyogenesis ve direk somatik embriyogenesis meydana getiren sürgünlerin üç farklı kültür ortamı denenerek kök gelişimleri sağlanmıştır.

$\frac{1}{2}$ MS+%1 sakkaroz ilavesiyle oluşturulan A ortamında Temmuz ayının ikinci haftasında alınan (B2) embriyolarda (2cm) uzunluğunda kökler elde edilmiştir. MS+%3 sakkaroz ilavesiyle oluşturulan B ortamında Temmuz ayının üçüncü haftasında alınan (C1) embriyolardan (1,48cm) uzunluğundan kökler elde edilmiştir. MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür ilavesiyle oluşturulan C ortamında Temmuz ayı ikinci haftasında alınan (B1) embriyolardan (4,98cm) uzunluğunda kökler elde edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda köklendirme için en uygun ortam MS+%3 sakkaroz+%1 aktif kömür ilavesiyle oluşturulan C ortamı olmuştur.

Pierik, (1988) tarafından yapılan bir çalışmada; "Besi ortamındaki toksik bileşiklerin yok edilmesinde en etkin ve kolay yol aktif karbonun kullanılmasıdır. Ancak, aktif karbon toksik bileşiklerle birlikte ortamdaki oksin ve sitokin gibi organik bileşikler ile diğer birçok bileşiği de adsorbe etmektedir. Bir çok açıdan PVP toksik bileşiklerin adsorbsiyonunda başarılı sonuçlar vermektedir."

Bu çalışmada köklendirme aşamasında aktif kömür kullanılmış ve yüksek oranda sonuç alınmıştır.

2003 Ocak ayında *P. vera* L. cv Siirt 25 yaşındaki ağaçların 2 yıllık genç sürgünlerinin tepe ve yan tomurcuklarından alınan meristemler de yine *N. tabacum* cv Samsun yapraklarından geliştirilen kalluslar üzerinde kültüre alınmış daha sonra 4.0mg/lt BAP ilavesiyle hazırlanan MS ortamına aktarılmışlardır. Yan tomurcuklardan alınan meristemlerde mikrobiyal kontaminasyon gözlenmiştir. Bitki yüzeyleri mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarıdır. Yan meristemlerin etrafında çok sayıda yaprakçık bulunması, meristemlerin çıkarılması sırasında yaprakçık aralarında bulunan sporların kültürlerde gelişme ortamı bulması, kontaminasyona sebep olarak düşünülmektedir. Alınan 40 adet uç meristemin 20'sinde somatik embriyogenesis sağlanmıştır. 20 uç meristemin 16'sında fenolik birikimi, 4'ünde kontaminasyon gözlenmiştir. Bununda bazı uç meristemlerin küçük olmasından dolayı biriken fenoliği tolere edememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mederos vd., (1991) tarafından yapılan bir araştırmada *P. atlantica* Desf. anaçlarının uç ve yan tomurcuklarından önemli oranda sonuçların alındığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise *P. vera* L. cv Siirt 25 yıllık ağaçların 2 yıllık genç sürgünlerinden alınan tomurcuklar kullanılmış ve meristem kültürü 2003 Ocak ayında yapılmıştır. Yüksek oranda sonuç elde edilememesi kültür ortamının içeriğine, alınan türe ve sadece bir dönem alınması gibi sebeplere bağlanabilir. Sonuç olarak 'nurse culture' tekniği ile *N. tabacum* cv Samsun yapraklarından geliştirilen kalluslar fenolik bileşikleri önemli oranda engellemiş ve *P. vera* L. cv Siirt'te döllenmiş embriyolardan 2002 yetiştirme dönemi Temmuz ayı ikinci yarısında somatik embriyogenesis %100 oranında gerçekleştirilmiştir.

Alınan sonuçlar, beslenme ve bölge ekonomisi için tartışılmaz bir değere sahip olan Antepfıstığı'nın *in vitro* koşullarda kolaylıkla çoğaltılabilmesi ve bu meyve türünde yapılacak olan ıslah programlarının başarıyla yürütülebilmesini sağlayacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

Abousalim, A., (1991). Multiple shoots formation from *in vitro* germinating *Pistacia Vera L.* an *Pistacia atlantica Desf.* seeds. *Actes de l'institut Agronomique et Veterinaire Hassan II*, **11** 5-8

Abousalim, A., Mantell, SH., (1994). A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot cultures of *Pistacia vera* cv. Mateur. *Journal of Horticultural Science*, **69** 357-365

Abousalim, A., Hafdi, A., Kaska, N (ed)., Kuden, AB (ed)., Ferguson , L. (ed)., Michailides, T. (1995). Somatic embryogenesis in pistachio (*P. vera*): effect of subculture, growth regulators and explant type. First international symposium on pistachio nut, Adana, Turkey 20-24 sep, **419** 195-199

Ahmad, Z., Zaidi, N., Shah, FH. (1989). Callus formation from the mesocarp tissue of *Pistacia vera L.* *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, **32** 549-550

Ahmad, Z., Zaidi, N., Shah, FH. (1992). Suspension culture of *Pistacia vera L.* *Pakistan Journal of scientific and Industrial Research*, **35** 1-8

Anonim (2003). Antepfıstığının Besin Deęeri İşleme ve Depolaması. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, **10**

Babaoğlu; M., Gürel, E., Özcan, S.(Eds.). (2001). *Bitki Biyoteknolojisi -1- Doku kùltürü ve Uygulamaları* Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları

Barghchi, M., Alderson, P. G., (1983). *In vitro* propagation of *P. vera L.* from seedling tissues, *Journal of Horticultural Science*, **58**, 435-445

Barghchi; M., Alderson, PG., Blakesley, D.(1995). The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera L. in vitro*. Natural Environment Research council 'Tree Biotechnology Liaison Group'. Proceedings of the 15th annual meeting, 10-12 April 1995 Belfast, **20** 31-35

Bilgen, A.M. (1973). Antepfıstığı Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara

Büyükalaca, S., Gülen, H., Tanrıver, E., Kaska, N., Kuden, AB. (ed)., Dennis, FG. (1997). Embryo rescue on abortive pistachio seeds. *Acta Horticulturae*, **441** 307-308

Can, C., N. K, Koç., A, Çınar. (1992a). Meristem kùltürü tekniği ile karanfilde (*Dianthus sp.*) *in vitro* çoğaltım olanaklarının araştırılması *Doğa Dergisi*, **16** 148-157

Can, C., N. K, Koç., A, Çınar. (1992b). *in vitro* clonal propagation of sour orange (*Citrus aurantium* var. *Brezilia*) by using epicotyl segments. *Doğa Dergisi*, **16** 641-648

Chatibi, A., Kchouk, ME., Abdallah, FB., Zemni, H., Ghorbel, A., Kaska, N. (ed)., Kuden, Ab., Ferguson, L. (ed)., Michailides, T. (1995). Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv. Mateur by *in vitro* culture of apices and cuttings. *Acta Horticulturae*, **419** 213-220

Chatibi, A., Kchouk, ML., Mliki, A., Zemni, H., Ghorbel, A., Kuden, AB., Dennis, FG jr. (1997) Use of growth regulators for adventitious shoot regeneration and plant Propagation from mature cotyledons of pistachio (*Pistacia vera*) *Acta Horticulturae*, **441** 263-269

Chatibi, A., Kchouk, ML., Thamiy, S., Ghorbel, A., Khsib, T., Ferguson, L., Kester, D., (1998a). Multi variate analysis of the effects of growth regulators on the regeneration of Pistachio (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur from cotyledons. *Acta Horticulturae*, **470** 434-442

Chatibi, A., Kchouk, ML., Thamiy, S., Ghorbel, A., Ferguson, L., Kester, D., (1998b). Somatic embryogenesis in pistachio (*Pistacia vera* L.) cv. Mateur. *Acta Horticulturae*, **470** 460-466

Dolcet, Sanjuan, R., 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

Debergh, PC., Read, PE., (1993). Mikropropagation. In: Debergh, PC., Zimmerman RH (eds), *Micropropagation technology and Application.*, pp. 1-15, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda

FAO, (2001), *Production Yearbook*, ROME

FAO, (2002), *Production Yearbook*, ROME

Franklin, CI, Dixon, RA. (1994). Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), *Plant Cell Culture A practical Approach Second Edition*, pp. 1-27, Oxford University Press, Oxford, Uk.

Gamborg, OL., Phillips, GC. (1995). Laboratory facilities, operation, and management. In: Gamborg, OL., Phillips, GC. (eds), *Plant Cell, Tissue and organ culture, Fundamental Methods*, Springer- verlag, Berlin Heidelberg.

George, Ef., Scherrington, PD. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*, Exegetics Ltd, Basingstoke

George, Ef. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part I. The Technology, Second Edition, 574 , Exegetics Ltd., England

Ghoraishi, Sr., Mantel, SH., Davey, MR., (ed), Alderson, PG., Lowe, Kc. (ed)., Power, JB. (1998). Improved shoot growth and control of shoot-tip necrosis in *Pistacia mutica* and *p. vera* micropropagation systems. *Tree biotechnology towards the millenium*, 163-172

Gonzales, A., Frutos. D., (1990). *In vitro* culture of *P.vera* L. embryos and aged trees explants. *Plant aging basic and applied approaches*, **186** 335-338

Hagendorn, MJM., Zethof, JLM., Hunnik, E, van., Plas, LHW, van, der., Van, Hunnik, E., Van, der, Plas LHW. (1991). Regulation of anthocyanin and lignin synthesis in *Petunia hybrida* cell suspensions. *Plant cell Tissue and Organ Culture*, **27** 141-147

Hoque, A., Arima, S., (2002b). Overcoming phenolic accumulation during callus induction and in vitro organogenesis in water chestnut (*Trapa Japonica flerov*). *In vitro cellular and Developmental Biology Plant*, **38** 342-346

Jabeen, S., Zaidi, N., Zafar, F., Iqbal, MZ., Shah, FH. (!995). Induced histological changes in *Pistacia vera* L. cotyledonary tissue. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, **38** 264-266

Joley, J.E. (1979). *Sert kabuklu fistic(Antepfisticği)* Tar. Bak. Zir. İşl. Gen. Müd. Yayınları, Ankara, **154**

Julkunen, Tiitto, R. (1996). Defensive efforts of *Salix myrsinifolia* plantlets in photomixotrophic culture condition: the effect of sucrose, nitrogen and pH on the phytomass and secondary phenolic accumulation, *Ecoscience*, **3** 297-303

Keller, M., Steel, CC., Creasy, Gl., Bodson, M(ed)., Verhoyen, MNJ. (2000). Stillbene accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects. *Acta Horticulturae*, **514** 275-286

Koç, N.K., C., Can., A, Çınar. (1992). Effect on some culture media on somatic embogenesis and rooting in ovular callus of 'Shamouti' orange. (*Citrus sinensis* Osb.) *Doğa Dergisi*, **16** 140-147

Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., Hohtola, A., (2000). Changes in cellular structures and enzymatic activites during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree physiology*, **20** 467-475

Lemaister, J.(1959). *Le pistacher* (Etude bibliographique). *Fruits*, **14** 57-77

Lewis, CE., Walker, JRL., Lancaster, JE., Conner, AJ. (1998). Light regulation of anthocyanin flavonoid and phenolic acid biosynthesis in potato minitubers in vitro. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25** 915- 922

Lorenzo, JC., Angeles, Blanca, M, de, los., Palaez, O., Gonzales, A., Cid, M., Iglesias, A., Gonzeles, B., Escalona, M., Espinosa, P., Borroto, C., de, los, Angeles, Blanco, M (2001). Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Pla'nt cell Tissue and Organ Culture*, **65** 1-8

Matern, U., Grimming, B., Geibel, M (ed.), Treutter, D (ed.), Feucht, W.(1994). Naturel phenols as stress metabolites. *Acta Horticulturae*, **381** 448-462

Mederos, Molina, S., Lopez, Carreno, I., (1991). Control of orgenogenesis 'in vitro' of *Pistacia atlantica* Desf. rootstock. *Acta Horticulturae*, **289** 135-136

Merkel, B., Reichling, J. (1990). Comperative investigation on formation and accumulation of rare phenylpropanoids in plants and in vitro cultures of *pimpinella major*. *Zeitschrift fur Naturforschung section C Biosciences*, **45** 602-606

Murashige, T., Skoog. F. (1962). *Phsiol. Plant*, **15** 473-493

Negrel, J., Javelle, F.(1995). Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or pronase elicited cell suspension cultures of tabacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiologia Plantarum*, **95** 569-574

Nikpeyma, Y., Kaska, N., Kaska, N (ed.), Kuden, Ab (ed.), Ferguson, L. (1995). Effects of radicle tip pinching and gibberellic acid on the growth of container grown pistcia seedlings under glasshouse conditions. *Acta Horticulturae*, **419** 243-248

Onay, A. Firat, MZ., Namlı, O., (1997). An improved method for embling production in pistachio, *Pistacia vera* L. Using somatic embriyos matured in a liquid medium. *Turkish Journal of Biology*, **21** 159-174

Onay, A. Jeffree, CE., Yeoman, MM. (1995). Somatic embryogenesis in cultured immature kernels ofpistachio. *Pistacia vera* L.. *Plant Cell Reports*, **15** 192-195

Onay, A. Jeffree, CE., Yeoman, MM.(1996). Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embrogenic mass of pistachio, *Pistacia vera* L.. *Plant Cell Reports*, **15** 723-726

Onay, A. (2000a). Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turkish Journal of Botany*, **24** 91-95

Onay, A. (2000b). Microproagation of pistachio from mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **60** 159-162

Onay, A. (2000c). Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L. ) *Turkish Journal of Botany*, **24** 91-95

Onay, A.(2000d). Somatic embryogenesis from mature seed cultures of *Pisticia atlantica*. *Journal of Agriculture and Forestry*, **24** 465-473

Özbek, S., M, Ayfer. (1959). *Türkiye'de Antepfıstığı Anaçları ve Aşı Tekniği*. 1959 yıllığı fasikül 4, A.Ü.Z.F

Özbek,S. (1978). *Özel Meyvecilik* Ç.Ü. Zir. Fak. Yay., Adana

Parfitt, DE., Almehtdi, AA. (1994). Use of high CO<sub>2</sub> atmosphere and medium modifications for the successful micropropagation of pistachio. *Scientia Horticulturae*, **56** 321-329

Pierik, RLM., (1988). *In vitro* culture of higher plants as a tool in propagation of horticultural crops *Acta Horticulturae*, **226** 25-41

Pletsch, M., Piacente., S., Pizza, C., Charlwood, BV. (1993 ). The accumulation of phenylpropanoid glycosides in tissue cultures of *Tecoma sambucifolium*. *Phytochemistry*, **34** 161- 165

Porrot, WA., Merkle, SA., Williams AG. (1993). Somatic embriyogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray DR (ed), *Advanced Methods in plant Breeding an Biotechnology*, pp. 158-200, C.A.B. International,Uk.  
Rugini, E. (1992). Involvement of polyamines in auxin and *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting of fruit trees *in vitro*. *Journal of the Amerikan Society for Horticultural Science*, **117** 532-536

Santos, Gomes, PC., Seabra, RM., Andrade, Pb., Fernandes, Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant science*, **162** 981-987

Seitz, HU., Eilert, U., Luca, V, de; Kurz, WGW., Deluca, V., (1989). Elicitor mediated induction of phenylalanine ammonialyase and tryptophan decarboxylase: accumulation of phenols and indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant cell Tissue and Organ Culture*, **18** 71-78

Sheibani, A., Villiers, TA., Kaskan, N (ed.), Kuden, AB (ed.), Ferguson, L (ed.), Michailides, T. (1995). Effect of explant type and culture medium on micropropagation of three Pistacia Species. *Acta Horticulturae*, **419** 229-232

Smith, R. (1992). *Plant Tissue Culture Tecnigues and Exferiments*. Pp.1-27, Academic Press Inc., Uk.

T.C Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü.(1996). *Ekonomik ve Sosyal Göstergeler*, Gaziantep: Annonymous

Tekin, H., Arpacı, S., Altı, S., Açar, İ., Karadağ, S., Yükçeken,Y., Yaman, Abdullah.(2001). *Antepfıstığı Yetiştiriciliği*, Gaziantep **13**

Teutonico, RA., Dudley, MW., Orr, JD., Lynn, DG., Binns, AN. (1991). Activity and accumulation of cell division promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, **97** 288-297

Trautmann, IA., Visser, JH.(1991). The possible role of phenolic substances in the establishment of suspension cultures of guayule (*Parthenium argentatum gray*). *Bioresource Technology*, **35** 133-139

Woodroof, J.G. (1982). *Tree Nuts Production, Processing, Products*, Avi Publishing company Inc. Westport, Connecticut pp., 572 –603

Yang, ZH., Ludders, P. (1994). In vitro propagation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Gartenbauwissens chaft*, **59** 30-34

Yuri, A., Schmitt, E., Feucht, W., Treutter, D. (1990). Metabolism of prunus tissues affected by Ca<sup>2+</sup> deficiency and addition of prunin. *Journal of plant physiology*, **135** 692-692

Yücel, S., Onay, A., Çolak, G., Başaran, D., (1991). The researches of obtaining from *Pistacia vera* L. apical bud and nodal bud micropropagation. *Acta Horticulturae*, **289** 167-168

Zagoskina, NV., Dubravina, GA., Zaprometov, MN. (2000). The spesific features of chloroplasts and phenolic compound accumulation in photomixotrophic tea callus cultures. *Russian Journal of plant physiology*, **47** 468-473



## **EKLER**

### **EK 1. MS Ortamının Kimyasal Bileşenleri**

<b>KİMYASAL</b>	<b>mg/lt</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440
KNO <sub>3</sub>	1900
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16.9
Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	37.3
Thiamine HCL	0.1
Pyridoxine HCL	0.5
Nicotinic HCL	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Sucrose	30 gr/lt
Agar	8-10 gr/lt

## EK 2. Stok Solüsyonlar

<b>Kimyasallar</b>	<b>Oranlar(mg/100 ml)</b>
<b>A-</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1700
KI	8.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.5
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.25
<b>B-</b> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3700
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	169
Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	86
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.25
<b>C-</b> FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	278
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	373
<b>D-</b> Thiamine HCL	1
Pyridoxine HCL	5
Nicotinic HCL	5
Glycine	20

## EK 3. Sonradan İlave Edilen Kimyasallar

<b>Kimyasal</b>	<b>mg/lt</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440
KNO <sub>3</sub>	1900
Myo-inositol	100
Sucrose	30 gr/lt
Agar	8-10 gr/lt



## **BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR**

1. Can, C., Baloğlu, Ü., Sarpkaya, K., Özaslan, M., (2003). **Application of nurse culture technique to *Pistacia vera* cv *Siirt* immature embryos.** *XIII G. R. E. M. P.A. Meeting on Pistachios an Almonds.* 1-5 Haziran, PORTEKİZ.

