

33736

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ORMAN MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI

TİTREK KAVAK (Populus tremula L.) VE KAFKAS IHLAMURU (Tilia
rubra DC.)' NUN DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÜRETİLMESİ

Orm. Yük. Müh. Ali Ömer ÜÇLER

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

" Doktor "

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30.06.1994

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 28.09.1994

Tezin Danışmanı : Prof. Dr.Zeki YAHYAOĞLU

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Rahim ANŞİN

Jüri Üyesi : Doç.Dr.C.Ünal ALPTEKİN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Temel SAVAŞKAN

Haziran 1994

TRABZON

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

" Titrek Kavak (*Populus tremula* L.) ve Kafkas İhlamuru (*Tilia rubra* DC.) nun Doku Kültürü Teknikleri İle Üretilmesi " adlı bu çalışma, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmanın bir bölümü, TÜBİTAK tarafından desteklenmekte olan TBGTAG - 16 nolu projeyi içermektedir.

Doktora tezimin danışmanlığını üstlenerek gerek konunun seçilmesi ve gerekse hazırlanması sırasında yakın ilgi ve desteği ile çalışmalarımı yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Zeki YAHYAOĞLU'na teşekkür etmeyi zevkli bir görev sayıyorum.

Araştırmalarım sırasında, deneysel çalışmaların sürdürülmesi ve özellikle besin ortamlarının hazırlanmasındaki katkıları için çay ekseri teknikeri İhsan GÜNEŞ'e, sera çalışmalarındaki katkıları için Ömer SIRTKEYA ve Hasan EMİR'e şükranlarımı sunarım. Bitki materyalinin araziden sağlanması sırasında göstermiş oldukları yakından dolayı Şebinkarahisar Orman İşletme Müdürlüğü yönetimine ve materyallerin alınması sırasında bizzat eşlik eden yeğenim Vedat ÜÇLER'e teşekkür ederim.

Doktora tezinin yazım aşamasında, istatistiksel konularda yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Hakkı YAVUZ'a, grafiklerin çizimlerdeki katkıları için Arş.Gör. Mehmet KESKİNKOL ve teknisyen Kadir TOKLU'ya, ayrıca bitki materyalinin kültüre alınmasında kullanılan kültür kaplarının sağlanmasında çok büyük yardımlarını gördüğüm K.T.Ü. Farabi Hastanesi müdür yardımcısı Yunus TAŞ'a ve bütün emeği geçenlere teşekkür ederim.

Trabzon, Haziran 1994

Ali Ömer ÜÇLER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
TABLO LİSTESİ.....	XII
METİN İÇİNDE VE TABLOLARDAKI KULLANILAN KISALTMALAR	XIV
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2.Literatür Özeti.....	4
1.2.1. Kallus Kültürü İle İlgili Literatür Özeti.....	5
1.2.2. Organ Kültürü İle İlgili Literatür Özeti.....	8
1.2.3. Embriyo Kültürü İle İlgili Literatür Özeti.....	22
2.YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25
2.1. Materyal.....	25
2.1.1. Titrek Kavak İle İlgili Bitkisel Materyal.....	25
2.1.2. Kafkas İhlamuru İle İlgili Bitkisel Materyal.....	25
2.2.Yöntem.....	25
2.2.1. Materyalin Alınma Zamanı.....	25
2.2.1.1. Titrek Kavakta Materyalin Alınma Zamanı.....	25
2.2.1.2. Kafkas İhlamurunda Materyalin Alınma Zamanı.....	26
2.2.2. Besin Ortamlarının Saptanması ve Hazırlanması.....	26
2.2.2.1. Sakkaroz ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Seçimi.....	29
2.2.2.1.1. Titrek Kavakta Denenen Dozlar.....	29
2.2.2.1.2. Kafkas İhlamurunda Denenen Dozlar.....	32
2.2.3. Sterilizasyon.....	33
2.2.3.1. Besin Ortamlarının Sterilizasyonu.....	33
2.2.3.2. Bitkisel Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu.....	33
2.2.3.2.1. Titrek Kavaktan Elde Edilen Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu.....	34
2.2.3.2.2. Kafkas İhlamuru Tohumlarının Yüzeysel Sterilizasyonu	34
2.2.3.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu.....	34
2.2.4. Materyalin Kültüre Alınması.....	34

2.2.4.1. Titrek Kavak Materyalinin Kültüre Alınması.....	34
2.2.4.2. Kafkas Ihlamuru Materyalinin Kültüre Alınması.....	35
2.2.5. Ortam pH' sının Ayarlanması.....	35
2.2.6. Kültür Koşulları.....	35
2.2.7. Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler.....	36
2.2.7.1. Titrek Kavakta Yapılan Ölçüm ve Gözlemler.....	36
2.2.7.1.1. Explantlardaki Gelişme ve Sürgün Oluşumu.....	36
2.2.7.1.2. Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	36
2.2.7.2. Kafkas Ihlamurunda Yapılan Gözlem ve Ölçümler.....	36
2.2.8. Köklü Fideliklerin Şaşırtılması.....	37
2.2.8.1. Titrek Kavak Fideliklerinin Şaşırtılması.....	37
2.2.8.2. Kafkas Ihlamuru Fideliklerinin Şaşırtılması.....	37
2.2.9. Denemelerin Kurulması ve Değerlendirilmesi.....	37
2.2.9.1. Titrek Kavak İle İlgili Denemelerin Kurulması.....	37
2.2.9.2. Kafkas Ihlamuru İle İlgili Denemelerin Kurulması.....	37
2.2.9.3. Verilerin Değerlendirilmesi.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. Titrek Kavak İle İlgili Bulgular.....	38
3.1.1. Sakkaroz Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi.....	38
3.1.2. BAP Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi.....	39
3.1.3. BAP + IBA Doz ve Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi.....	48
3.1.4. Kinetin Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi.....	49
3.1.5. Kinetin + IBA Doz ve Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi.....	50
3.1.6. Farklı Ortetlere Ait Explantların 0.2 ve 0.5 mg/l BAP Dozlarındaki Gelişme Durumları.....	52
3.1.7. IBA + NAA Doz ve Kombinasyonlarının Mikroçeliklerin Köklenmesi Üzerine Etkileri.....	69
3.1.8. Mikroçeliklerin Direk Olarak Topraklı Ortamda Köklendirilmesi	72
3.1.9. Köklendirilen Mikroçeliklerin Sera Koşullarına Uyum Çalışması	75
3.2. Kafkas Ihlamuru İle İlgili Bulgular.....	79
3.2.1. Sakkaroz Dozlarının Embriyo Gelişimine Etkisi.....	79
3.2.2. BAP ve IBA Dozlarının Embriyo Gelişimine Etkisi.....	83
3.2.3. Tohumların Farklı Toplama Zamanlarının 30 g/l Sakkaroz Ortamında Embriyo Gelişimine Etkisi.....	84

3.2.4. Bitkiciklerin Sera Koşullarına Uyum Çalışması.....	85
4. İRDELEME VE DEĞERLENDİRME.....	89
4.1. Titrek Kavak İle İlgili Bulguların İrdelenmesi ve Değerlendirilmesi...	89
4.2. Kafkas İhlamuru İle İlgili Bulguların İrdelenmesi ve Değerlendirilmesi	94
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	97
6. KAYNAKLAR.....	100
7. ÖZGEÇMİŞ.....	115



ÖZET

Titrek Kavak (*Populus tremula L.*) ve Kafkas İhlamuru (*Tilia rubra DC*) nun Doku Kültürü Teknikleri İle Üretilmesi

Bu çalışmada titrek kavakta; farklı sakkaroz, BAP, BAP + IBA, kinetin, kinetin + IBA doz ve kombinasyonlarının sürgün oluşumundaki etkileri araştırılmıştır. Bunun için, vejetasyon dönemi dışında alınan tomurcuk eksplantları MS ve WPM adlı besin ortamlarında kültüre alınmışlardır

Denemeler sonucunda BAP'ın WPM ortamında özellikle de 0.2 mg/l BAP dozunun; sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ve sürgünlerdeki nod sayısı bakımından diğer dozlara (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) göre daha etkili olduğu ortaya konmuştur. BAP + IBA, kinetin, kinetin + IBA doz ve kombinasyonlarında sürgün oluşumu görülmemiştir. MS ortamında tüm dozlarda sürgün oluşumuna yönelik bir gelişme olmamıştır.

Bundan sonraki aşamada, değişik yaşlı 6 ortete ait tomurcuk eksplantları 0.2 ve 0.5 mg/l BAP'ın eklendiği WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır. Ortete bağlı olarak sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayılarında farklılıkların olduğu belirlenmiştir. 0.2 mg/l BAP dozu 0.5 mg/l BAP dozuna göre daha etkili bulunmuştur.

Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için in vitro ve in vivo'da olmak üzere iki farklı yöntem denenmiştir. İn vivo'da köklendirmede bir toprak karışımı kullanılmış ve in vitro'da köklenmeye göre daha başarılı olunmuştur. Mikroçeliklerde % 100 köklenme ve yaşama sağlanmıştır.

Kafkas ihlamurunda; farklı sakkaroz, BAP ve IBA dozlarının embriyo gelişimi ve fidecik oluşturmadaki etkileri, ayrıca farklı zamanlarda toplanan tohumların embriyolarının sakkarozlu ortamdaki gelişimi araştırılmıştır.

Denemeler sonucunda, gerek MS ve gerekse WPM ortamlarında sakkaroz (10, 20, 30 ve 40 g/l) tek başına eklendiğinde, embriyolar fidecik oluşturmuştur. En etkili sakkaroz dozunun 30 g/l olduğu belirlenmiştir. BAP (0.1 ve 0.2 mg/l) ve IBA (0.1 ve 0.2 mg/l) eklenen ortamlarda embriyolar fidecik oluşturmamıştır. IBA eklenen ortamlarda embriyolar yeşil kalmış, BAP eklenen ortamlarda embriyolar kahverengileşmiştir.

Farklı zamanlarda toplanan tohumların embriyolarının 30 g/l sakkaroz eklenen ortamlardaki gelişmeleri farklı olmuştur. Tam olgunlaşmadan toplanan tohumların embriyoları fidecik oluşturmamıştır. Olgun haldeki tohumların embriyolarında ise fidecik oluşumu mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler : Organ Kültürü, Embriyo Kültürü, İn Vitro, Titrek Kavak, Kafkas İhlamuru

SUMMARY

Propagation of European Aspen (*Populus tremula* L.) and Caucasian Linden (*Tilia rubra* DC.) Using By Tissue Culture Techniques

In this study, in european aspen was studied the effect of different sucrose, BAP, BAP + IBA, kinetin, kinetin + IBA concentrations and combinations on shoot formation. For that reason, bud explants taken during the dormancy period were cultured into two medium known as the MS and WPM.

It was found that the BAP into the WPM media of 0.2 mg/l BAP concentration was more effective than that of other BAP concentrations, in respect to shoot lenght and shoot and nod number. Shoot formation was not observed in BAP + IBA, kinetin, kinetin + IBA concentrations and combinations. Shoot formation was not also observed in all MS medium.

The bud explants belonging the six different ages individuals were cultured into WPM of 0.2 and 0.5 mg/l BAP. The shoot and nod number and shoot length were different depending on individuals.

Two different methods consisting of in vitro and in vivo were used for rooting of microcuttings and the rooting in vivo was found to be more successful for rooting and survival than in vitro

In caucasian linden, the effect of different sucrose, BAP and IBA concentration on embryo development and plantlet formation and the seeds collected in different time and cultured in sucrose media on the development of embryos were investigated.

Experiments showed that when sucrose (10, 20, 30 and 40 g/l) only supplemented into both MS and WPM media, embryos grew plantlets. It was found that the most effective concentration of sucrose was 30 g/l. Embryos cultured in IBA (0.1 and 0.2 mg/l) medium became grenish and others cultured in BAP (0.1 and 0.2 mg/l) became brownish.

The development of embryos of collected in different time the seeds was also different. The embryos of mature seeds were become plantlets while others collected from the immature seeds were not.

Key Words : Organ Culture, Embryo Culture, In Vitro, European Aspen, Caucasian Linden.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1 : WPM ve MS Ortamlarında 10, 20, 30 ve 40 g/l Sakkaroz Dozlarında 3 Hafta Sonra Gelişme Durumu (İkişerli Gruplardan Soldakiler WPM, Sağdakiler MS ortamlarındaki Gelişmeleri Göstermektedir)
- Şekil 2 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Eksplantlardaki Gelişme Durumu
- Şekil 3 : MS + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Eksplantlardaki Gelişme Durumu
- Şekil 4 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 10 Hafta Sonra Sürgün Gelişimi
- Şekil 5 : WPM + 2.0 mg/l BAP Ortamında Kültürden 10 Hafta Sonra Sürgün Gelişimi
- Şekil 6 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Sürgün Sayısına Etkisi
- Şekil 7 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Ortalama Sürgün Uzunluğuna Etkisi
- Şekil 8 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunluğuna Etkisi
- Şekil 9 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Ortalama Nod Sayısına Etkisi
- Şekil 10 : Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında Sürgün Çoğalması ve Kök Oluşumu
- Şekil 11 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi
- Şekil 12 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Seleksiyonu İle Yaprak Yüzeylerinin Artması
- Şekil 13 : BAP' ın (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l), IBA (0.1 mg/l) İle Kombine Edilerek Eklendiği MS Ortamlarında, Eksplantların Kültüre Alınmadından 1 Ay Sonraki Gelişme Durumu

- Şekil 14 : BAP'ın (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l), IBA (0.1 mg/l) İle Kombine Edilerek Ekendiği WPM Ortamlarında, Ekspantların Kültüre Alınmasından 1 Ay Sonraki Gelişme Durumu
- Şekil 15 : MS + 0.5 mg/l Kinetin Ortamında Kültürden 1 Ay sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu
- Şekil 16 : WPM + 0.5 mg/l Kinetin Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu
- Şekil 17 : WPM ve MS'nin 0.2 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA Eklendiği Ortamlarında Kültürden 1 Ay Sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu (Soldaki İki Tüp WPM, Diğer İki Tüp MS ortamındaki Gelişmeyi Göstermektedir.)
- Şekil 18 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O4 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 19 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O4 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 20 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O5 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 21 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O5 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 22 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 23 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması
- Şekil 24 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Sayısı
- Şekil 25 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunlukları
- Şekil 26 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Uzunlukları
- Şekil 27 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Nod Sayısı Farklılıkları
- Şekil 28 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Sayısı

- Şekil 29 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunluğu
- Şekil 30 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Uzunluğu
- Şekil 31 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Ortalama Nod Sayısı
- Şekil 32 : O4 Nolu Ortetin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması
- Şekil 33 : O5 nolu Ortetin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması
- Şekil 34 : O8 Nolu Ortetlerin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında, WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması
- Şekil 35 : O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantta WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi
- Şekil 36 : O5 Nolu Ortetde WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi
- Şekil 37 : 1/2 WPM + 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA Ortamında Mikroçeliklerin Kültürden 1 Ay Sonraki Köklenme Durumu
- Şekil 38 : 1/4 WPM + 2.0 mg/l IBA + 0.1 mg/l NAA Ortamında Mikroçeliklerin Kültürden 1 Ay Sonraki Köklenme Durumu
- Şekil 39 : Farklı IBA + NAA Kombinasyonlarının Mikroçeliklerin Köklenme Oranına Etkileri
- Şekil 40 : Kasalara Şaşırtılmış Mikroçeliklerin Şaşırtmadan Hemen Sonraki Görünüşleri
- Şekil 41 : Mikroçeliklerin Şaşırtılmasından 8 Gün Sonra Köklenme Durumu
- Şekil 42 : Mikroçeliklerin Topraklı Ortama Şaşırtılmasından 15 Gün Sonra Köklenme Durumu
- Şekil 43 : Kasalara Şaşırtılmış Mikroçeliklerde 15 Gün Sonra Yaşama ve Gelişme Durumu
- Şekil 44 : Kasalarda Köklenmesi Gerçekleşmiş Olan Fideciklerin Mikroçelik Olarak Tepsi Saksılara Şaşırtılmasından 1.5 Ay Sonraki Görünüşü

- Şekil 45 : Tüplere Şaşırtılmış Fideciklerin Köklendirme Aşamasından 1.5 Ay Sonraki Gelişme Durumu**
- Şekil 46 : Kasaya Şaşırtılmış Mikroçeliklerin Köklenmesi İle Birlikte Başlangıçtan 1.5 Ay Sonraki Gelişme Durumu**
- Şekil 47 : Titrek Kavakta Doku Kültürü İle Üretilen 1 Yaşındaki Fidanların Görünüşü**
- Şekil 48 : Titrek Kavakta Doku Kültürü İle Üretim Şeklini Gösteren Akış Şeması**
- Şekil 49 : İzole Edilmiş Kafkas İhlamuru Embriyolarının Görünüşü**
- Şekil 50 : MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Epikotil Uzunlukları (Kültüre Alındıktan 30 Gün Sonra)**
- Şekil 51 : MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Kök Uzunlukları (Kültüre Alındıktan 30 Gün Sonra)**
- Şekil 52 : Embriyoların Kültüre Alınmasından 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarında Embriyo Gelişimi (Soldakiler 0.2 mg/l BAP' lı, Ortadakiler 0.2 mg/l IBA'lı, Sağdakiler İse 30 g/l Sakkarozlu Ortamdaki Gelişmeyi Göstermektedir.)**
- Şekil 53 : 3 - 5 Ağustos 1993 tarihleri Arasında Toplanan Tohum Embriyolarının Kültürden 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarındaki Gelişme Durumu**
- Şekil 54 : 25 - 30 Ağustos 1993 Tarihleri Arasında Toplanan Tohum Embriyolarının Kültürden 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarındaki Gelişme Durumu**
- Şekil 55 : Şaşırtılmış ve Üzerleri Şeffaf Kaplarla Örtülmüş Kafkas İhlamuru Fidecikleri**
- Şekil 56 : Saksıya Şaşırtılmış Kafkas İhlamuru Fideciğinin Şaşırtmadan İki Hafta Sonraki Görünüşü**
- Şekil 57 : Kafkas İhlamurunda 1 Yaşındaki Fidanların Görünüşü**
- Şekil 58 : Kafkas İhlamurunda Embriyo Kültürü İle Üretim Şeklini Gösteren Akış Şeması**

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1 :Titrek Kavakta Sürgün Alınan Ortetlere Ait Bilgiler
- Tablo 2 : MS ve WPM Temel Besin Ortamlarının İçerikle
- Tablo 3:MS ve WPM Temel Besin Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Stok Eriyikleri
- Tablo 4 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 5 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 6 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP + IBA Dozları , Sakkaroz ve Miktarları
- Tablo 7 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Kinetin Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 8 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Kinetin + IBA Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 9 : O3, O4, O5, O6 ve O7 ve O8 No lu Ortetlerde Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 10 : Sürgünlerin Köklenmesi İçin Ortamlara Eklenen IBA + NAA Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 11 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Sakkaroz Dozları ve Agar Miktarları
- Tablo 12 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 13 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen IBA Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları
- Tablo 14 : Farklı BAP Dozlarında Kültüre Alınan Eksplantlardaki Gelişme Durumları (Kültür Başlangıcından 10 Hafta Sonra)

Tablo 15 : WPM Ortamında Farklı BAP Dozlarındaki Eksplantlarda Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Tablo 16 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Gelişme Sonuçları (Kültür Başlangıcından 10 Hafta Sonra)

Tablo 17: WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Değişik Ortetlerden Kültüre Alınan Eksplantlarda, Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Tablo 18 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Gelişme Sonuçları

Tablo 19 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında Değişik Ortetlerden Kültüre Alınan Eksplantlarda, Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Tablo 20 : Kültürden 10 Hafta Sonra 0.2mg/l ve 0.5 mg/l BAP Dozları Arasındaki Değişimlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Tablo 21 : Sürgünlerin Köklendirilmesinde Denenen Ortamlar ve Köklenme Durumları

Tablo 22 : MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Gelişme Durumları

Tablo 23 : Farklı Sakkaroz Dozlarında Kültüre Alınan Embriyolarda, Kültürden 30 Gün Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

METİN İÇİNDE VE TABLOLARDA KULLANILAN KISALTMALAR

WS	: Wolter ve Skoog (1966) besin ortamı
BAP	: Benzilaminopurin
NAA	: Naftalen asetik asit
LS	: Linsmaier ve Skoog (1965) besin ortamı
WPM	: Woody Plant Medium (1981) besin ortamı
MS	: Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
IBA	: Indol - 3 - bütirik asit
2.4-D	: Diamin tetra asetik asit
ACM	: Aspen Culture Medium (1983) besin ortamı
ABA	: Absisik asit
IAA	: Indol - 3 - asetik asit
B ₅	: Gamborg ve diğ. (1968) besin ortamı
DKW	: Driver ve Kunuyuki (1984) besin ortamı
GD	: Gresshoff ve Doy (1972) besin ortamı
BTM	: Broad - leaved Tree Medium (1983) besin ortamı
IS	: Ide ve Saito (1985) besin ortamı
H	: Heller (1953) besin ortamı
SH	: Shenk ve Hildebrant (1972) besin ortamı
DL	: Durzan ve Lopushansky (1983) besin ortamı
QP	: Quorin ve Lepoivre (1977) besin ortamı
GA ₃	: Giberellik asit
AC	: Activated Charcoal
mg	: miligram
g	: gram
l	: litre
N	: Normalite
NaOH	: Sodyum hidroksit
KOH	: Potasyum hidroksit
1/2	: Yarım kuvvette besin içeren ortam
1/4	: Dörtte bir kuvvette besin içeren ortam
1/3	: Üçte bir kuvvette besin içeren ortam
1/5	: Beşte bir kuvvette besin içeren ortam

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ülke topraklarımızın % 72'si, ormanlarımızın ise % 56'sı çeşitli şiddette erozyona bağlı olup her yıl kaba bir hesapla 380 milyon ton verimli üst toprağın akarsular vasıtasıyla denizlere, göl, gölet ve barajlara taşınarak verim azalmasına; sel taşkın gibi çeşitli zararlara sebebiyet verdiği bilinmektedir (1).

Ülkemiz ormanlarında üretilen odun hammaddesi gereksinimi karşılayamayacak durumdadır. Öte yandan dünya nüfusunun sürekli artması ve yenilenemeyen kaynakların gün geçtikçe azalması karşısında, orman ve orman ürünlerine duyulan isteklerin gelecek yıllarda daha da artacağı beklenmektedir. İşte bu nedenledir ki, günümüz ormancısı bugün mevcut genetik rezervleri korumak ve bunları çeşitli şekillerde çoğaltmak zorundadır. Genetik ıslah çalışmaları olarak adlandırılan bu çalışmaların başarısı herşeyden önce, mevcut genetik çeşitliliğe ve kullanılan ıslah yöntemlerinin kalitesine bağlıdır.

Orman ağaçları ıslahında günümüze değin çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bunlar hala kullanılmaktadır. Geleneksel olarak orman ağaçlarının ıslah programlarında vejetatif çoğaltmanın rolü büyüktür. Yalnızca aseksüel metodları kullanarak genetiksel olarak aynı özellikleri taşıyan selekte edilmiş genotipleri aynı şekilde üretmek mümkündür (2). Bu yolla üretilen bireylerin hepsi ortetin kalıtsal özelliklerini aynen taşımaktadırlar (3).

Odunsu bitki türlerinin vejetatif olarak çoğaltılmasını geniş bir şekilde gerçekleştirmek için; çelikle üretme (vejetatif üretme) ve in vitro'da üretme (mikrovejetatif üretme) gibi iki teknikten söz edilebilmektedir (2). Vejetatif üretmenin geleneksel yöntemi çeliklerin köklendirilmesidir. Buna karşın, bir ağaç türünden verilen bir sürede, çoğaltılan bireylerin sayısı genel olarak küçük oranlardadır. Hızlı üretimi sınırlandıran faktörler çoğu kez uygun yer ve uygun bitkisel materyal bulunamamasıdır. Bu nedenle doku kültürü tekniğinin bir avantaj olarak görüldüğü bildirilmektedir (4).

Öte yandan, birçok orman ağacı türleri ve çalı formundaki odunsu bitkilerin tohumları, optimal çimlenme koşullarını bulsalar dahi, önceden bazı ön işlemlere tabi tutulmamışlarsa, çimlenememekte ya da yeknesak (uniform) ve zamanında bir çimlenme göstermemektedirler. Bu tip tohumlar çimlenme engeli olan tohumlardır. Bu engelleri gidermeden bunlardan sonuç almak güçtür hatta normal sürede imkansızdır (5). Doku kültürü tekniği bu engellerin de ortadan kaldırılmasında alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

Bitki doku kültürleri temelde bir üretim yöntemidir. Bilinen diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir doku parçasının (eksplant) sterilize edildikten sonra, çeşitli besin maddelerini içeren steril gıda ortamında (in vitro) ve uygun çevre koşullarında (ışık, rutubet ve sıcaklık) kültüre alınması işlemidir (6).

Genetikçiler doku kültürü tekniğini, seçilmiş genotiplerin değerlendirilmesinde, hızlı büyüyen fertlerin ortaya çıkarılmasında, soğuğa, kuraklığa hastalıklara, tuzluluğa ve herbisitlere dayanıklı bireylerin seçilmesinde etkin bir şekilde kullanabilecekler ve bu tür bireyleri ağaçlandırma çalışmalarında kullanmak suretiyle de hektardaki artım büyük ölçüde artacaktır (7). In vitro teknikleriyle nisbeten problemsiz ve hızlı üretim ihtimali, daha ileri ıslah adımlarında kullanılacak önemli avantajlar sunmaktadır (8).

In vitro tekniklerinin, ağaç ıslah programlarının gerçekleştirilmesi için sağladığı olanaklar;

Tipik genotiplerin hızlı üretimi,

Dayanıklılık için in vitro' da erken seleksiyon,

Klasik vejetatif çoğaltma için gençleştirme,

Mikrop ve virüsten arındırılmış bitki elde edilmesi,

Haploid bitkilerin üretilmesi,

Mutantların seçimi ve üretimi,

Genetik çeşitliliğin saklanması (soğuk saklama ve dondurarak saklama),

Somatik embriyo oluşumu ve yapay tohum üretimi,

Protoplast kültürü ile in vitro' da somatik hibridizasyon ve

DNA teknolojisiyle gen transferi şeklinde özetlenebilir (9).

Diğer taraftan doku kültürü ile üretimin vejetasyon dönemine bağlı olmaması, bir klonu sınırsız bir şekilde üretme olanağı vermesi, poliploid bireyler elde edebilme ve gen bankaları (doku bankaları) kurma gibi yararları yanında çelikle üretilmesi zor olan bazı bitki türlerinin bu yöntemle

kolayca üretilmesi, zengin tohum yıllarının seyrek olduğu ve tohumlarının uzun süre saklanması mümkün olmadığı veya güç olduğu ağaç türlerinin üretilmesinde de önem taşımaktadır (2).

Bu çalışmada, tür olarak seçilen titrek kavak (*Populus tremula* L.) ve kafkas ıhlamuru (*Tilia rubra* DC.), klasik üretim yöntemlerinde bazı problemleri olan ve kullanım alanlarının çeşitliliği bakımından günümüzde gittikçe önem kazanan orman ağacı türlerimizdendir.

Titrek kavak, ülkemiz orman mntikalarında en çok görülen kavak türü olup, çeşitli nedenlerle (yangın v.b) açılan alanlara ilk gelip yerleşen öncü türlerdendir. Odunu kibrit ve kağıt sanayinde çok kullanılmaktadır (10). Kültür kavaklarının yetişemediği fakir topraklarda yetişebilme özelliği, bu kavağın yayılmasında büyük bir avantaj olarak düşünülmektedir (11).

Türkiye Milli Kavak Komisyonu'nun saptamalarına ve amenajman planının verilerine göre Ülkemizde yaklaşık 7000 ha'lık doğal kavak alanı bulunmaktadır. Bu alanlar genel olarak titrek kavaktan oluşmaktadır (12).

Titrek kavağın da içinde yer aldığı Leuce seksiyonuna ait bazı türlerin (*Populus tremula* L., *Populus canescens* (Alton) Sm. ve *Populus tremuloides* Michx.) çeliklerinin köklendirilmesi zor olmaktadır. Bu engel kök çelikleri kullanılarak aşılabilir (13). Ancak kök çelikleri ile fidan üretimi, kitle halinde fidan üretimi için yeterli ve ekonomik değildir.

Günümüzde bazı Avrupa ülkelerinde titrek kavağa çok büyük önem verildiği ve yalnızca Rusya'da kontrplak, fıçı imali ve kibrit endüstrisi için yılda 3 milyon m³ titrek kavak odununa ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (14).

Ülkemizde de son yıllarda titrek kavağa verilen önem gün geçtikçe artmaya başlamış olup, yamaç arazilerin ağaçlandırılmasında kullanılacak en uygun kavak türü olabileceği vurgulanarak, bu türün korunmaya alınması ve genetik rezerv olarak ayrılıp ıslah edilerek ağaçlandırma projelerine sokulması önerilmektedir (15). Bununla ilgili olarak gen kaynaklarının yerinde (in situ) ve kaynağının dışında (ex situ) korunması için 1993 yılından itibaren bir çalışmanın başlatıldığı ve bu türe ilişkin olarak biogenetik rezerv alanlarının seçilip korunmaya alındığı bildirilmektedir (16).

Kafkas ıhlamuru ise ülkemizde doğal olarak Anadolu'nun değişik orman bölgelerinde, özellikle Kuzeydoğu Anadolu'da çok görülmektedir. Öte yandan Batı Anadolu'da Kazdağı ve Kuşadası'nda, ayrıca Antalya

yörelere rastlanmaktadır (10). Odun ve çiçeklerinden faydalandığı gibi, söz konusu tür aynı zamanda dekoratif bir süs bitkisidir (17).

Ihlamur türlerinin açık renkli işlenmesi kolay, hafif odunları özellikle tersimat masaları yapımında çok uygundur. Aynı zamanda protez sanayinde önde gelen bir ağaçtır. Son yıllarda kurşun kalem sanayinde de başarıyla kullanılmaktadır (10).

Ihlamur türlerinin tohum kabuğu ve embriyo dinlenmesinden kaynaklanan çimlenme engeli vardır. Bu nedenle bu çift engeli önce 1- 5 ay süre ile sıcak katlama ve bunu takiben 4 - 5 ay soğuk katlama ile gidermek gerekmektedir. Ihlamur türleri ağaç diplerinden çıkan kök sürgünlerinin dipten sökülmesi veya tepe daldırmasına tabi tutulması suretiyle üretilebilirler (18). Ancak, titrek kavakta olduğu gibi kitle halinde fidan üretimi için bu yöntemler yeterli ve ekonomik değildir.

Bu çalışmada; titrek kavakta çelikle üretmenin zor olması, kaffas ihlamurunda tohumda çimlenme engelini bulunması gibi klasik üretme yöntemlerindeki bazı problemler nedeniyle, bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılarak bu problemlerin ortadan kaldırılması ve bunun sonucunda da in vitro koşullarda, zamana bağlı kalmaksızın daha hızlı ve daha seri üretim sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.2. Literatür Özeti

Orman ağaçlarında dokuların ilk kez, 1934 yılında Gautheret tarafından kültüre alındığı (19) ve bundan 6 yıl sonra yine Gautheret tarafından *Ulmus campestris* Mill.'de yapılan çalışmada kallus çoğalması ve adventif tomurcuk farklılaşması elde edildiği bildirilmektedir (2).

1964 yılında Mathes (21, 22) triploid bir *Populus tremuloides* Michx.'in gövde eksplantlarını kullanarak kallus oluşumu ve kök farklılaşmasının elde edildiğini belirtmektedir.

Doku kültürü ile ilgili çalışmalar, 1975 yılına kadar kallus kültürü ile bitki rejenerasyonu esasına dayandırılmıştır (23).

Günümüzde in vitro'da, çeşitli bitki türlerinin doku kültürü tekniği ile üretilmesinde; kallus kültürü, organ kültürü, embriyo kültürü, hücre ve protoplast kültürü kullanılmaktadır (6, 24, 25, 26). Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinde 3 farklı yöntem izlenmektedir. Bunlar; nodal eksplantlarda mevcut koltuk tomurcuklarından sürgünlerin gelişmesi, eksplantlar üzerinde direk olarak adventif

tomurcukların farklılaşması ve hücre ya da kallus kültürlerinde somatik embriyoların oluşmasıdır (27, 28, 29, 30). Embriyo kültürü ile bitki rejenerasyonu ise embriyoların, direkt olarak kültür ortamında kültüre alınmasıyla sağlanmaktadır (6, 31).

1.2.1. Kallus Kültürü İle İlgili Literatür Özeti

Doku kültürü ile üretim tekniğinin geliştirilmesinde başlangıçta, kallus kültürü sıkça kullanılmıştır. Ancak kallus dokuları uzun bir zaman süresince kültüre alındığında, genel olarak genetik yapıda bir değişime neden olmaktadır (4,26)

Wolter (32) diploid *Populus tremuloides* Michx.'de yapmış olduğu çalışmada, genç ortolların gövde segmentlerini eksplant olarak kullanmış ve kallus kültürü ile bitki farklılaşması sağlamıştır. Araştırmacı WS ortamına BAP (0 - 0.5 mg/l) ve NAA (0 - 10 mg/l)'yi farklı dozlarda ekleyerek bunların etkilerini incelemiştir. Bulgulara göre, optimum sürgün oluşumunun 0.1 - 0.2 mg/l BAP eklendiğinde gerçekleştiği, 0.5 mg/l BAP'ın ortama eklenmesinin sürgün oluşumunda engelleyici etki yaptığı bildirilmektedir. Kallus dokusu üzerinde oluşmuş sürgünler kesilerek sitokinin ve oksin bulunmayan ortama nakledildiğinde, köklenmenin 3 - 4 hafta sonra gerçekleştiği belirtilmektedir.

Winton (33) triploid *Populus tremuloides* Michx.'de genç bireylerden elde ettiği gövde eksplantlarını modifiye WS ortamında kültüre almıştır. BAP, kültür ortamına 0.05 - 0.2 mg/l olarak eklenmiş ve en iyi sürgün oluşumu 0.05 mg/l BAP'ın eklendiği ortamlarda görülmüştür. Kesilmiş sürgünlerde kök oluşumunun ise ortalama 2.4-D'nin 0.05 mg/l ve kinetinin 0.1 mg/l olarak eklenmesiyle mümkün olduğu ortaya konmuştur.

Yine Winton (34, 35) yaptığı başka araştırmalarda kallus kültürü ile triploid *Populus tremuloides* Michx.'de ve tetraploid *Populus tremula* L.'da sürgün farklılaşması elde etmiştir.

Populus nigra cv. *italica*'da Vanverloo (36) tarafından yapılan araştırmanın sonuçlarına göre; başlangıç eksplantı olarak genç fidanların internodları kullanıldığında elde edilen kallus dokularında 2 - 8 adet sürgün elde edilmiştir. Yine bu çalışmanın sonuçlarına göre, denenen dört farklı sitokininden (zeatin, kinetin, BAP ve 2IP) sürgün oluşumunda en etkilisinin zeatin olduğu belirtilmektedir.

Chalupa (37, 38) *Populus nigra* L., *Populus canescens* (Aiton) Sm., *Populus x euramericana* Dode. ve *Populus tremula* L.'da genç fidanların

sürgün internodlarını eksplant olarak kullanarak rejenere bitkiler elde ettiğini, ortam olarak LS temel besin ortamı kullanıldığını, BAP ortama 0.05 - 5.0 mg/l eklendiğinde kallusların % 60 - 80'inde sürgün farklılaşması olduğunu ve kesilen sürgünler, modifize WS ortamında 0.4 mg/l NAA eklenerek kültüre alındığında köklenmenin 2 - 4 hafta içerisinde gerçekleştiğini bildirmektedir.

Lester ve Berbee (39) kallus kültürü ile *Populus nigra* L. ve *Populus x euramericana* Dode.'da elde ettikleri fideciklerin kromozom sayılarında, yaprak özelliklerinde, dal sayısında ve boylarında geniş farklılıkların olduğunu belirtmektedirler.

Populus deltoides Marsh.'de 15 farklı genotipin kallus ve sürgün oluşturma kapasitesini belirlemek amacıyla, Coleman ve Ernst (40) tarafından yapılan araştırmada, kültürden 60 gün sonra 2 genotipin en fazla sürgün oluşturduğu 6 genotipin sürgün oluşturmadığı ve diğer 7 genotipin ise az oranda sürgün oluşturduğu, ortam olarak modifize WPM ortamının kullanıldığı ve 0.5 mg/l zeatin ve 0.5 mg/l 2.4-D'nin bu ortama eklendiği bildirilmektedir.

Huhtinen ve Yahyaoğlu (41) *Betula pendula* Roth.'da yaptıkları çalışmada, kinetin ve IAA 'yı modifize edilmiş MS ortamına 0.5 mg/l ve 25 mg/l olarak ekleyerek, kallus kültürü ile sürgün oluşumu elde etmiş ve bu sürgünleri ortama, 0.01 mg/l 2.4-D ekleyerek köklendirmişlerdir.

Yahyaoğlu (42) *Betula pendula* Roth. ve *Picea abies* (L) Karst.'in kambial dokularını kullandığı araştırmasında *Betula pendula*'da rejenere bitkiler, *Picea abies*'de ise kallus oluşumu elde etmiştir.

Huhtinen (43) ve Srivastava ve Steinbauer (44) anter kültürü ile elde ettikleri kallus dokusu, Simola (45) genç yapraklardan elde ettiği kallus dokusu, Srivastava ve ark. (46) ise, genç yapraklardan ve köklerden elde ettikleri kallus dokusu ile yine *Betula pendula* Roth.'da çok sayıda rejenere fidecikler elde etmişlerdir.

Saito ve Ide (47) *Betula platyphylla* Skatchev'da yaşlı ortetlerden aldıkları sürgünlerin internodlarını kallus kültürü için kullanmıştır. MS besin ortamına BAP, 0.8 ve 1.2 mg/l olarak eklendiğinde sürgün oluşumu gözlemlendiği ve kesilen sürgünlerin 1/2 MS ortamına 0.5 mg/l IBA ve 0.02 mg/l ya da 0.2 mg/l NAA eklenerek köklendirildiği bildirilmektedir.

Chalupa (48) *Ulmus campestris* L.'de modifize MS ortamında, kallus kültürü ile sürgün farklılaşması elde etmiştir. Sürgün farklılaşması için, BAP' in ortama 0.5 - 1.0 mg/l olarak eklendiğine ve elde edilen sürgünlerin WS

besin ortamına 0.5 mg/l IBA'nın ilave edilmesiyle köklendiğine değinilmektedir.

Yine Derevyankin (49) *Ulmus türleri* (*U. pumila* Pall., *U. leavis* Pallas ve *U. carpinifolia* Gledisch.)'nde yapmış olduğu çalışmada, yaşlı ortet tomurcukları ve 10 - 12 günlük fidancıkların kök ve hipokotillerini kullanarak oluşturduğu kallus dokuları üzerinde bitki rejenerasyonunu sağlamıştır. Ancak sürgün oluşumunun gerçekleşmesinde test edilen sitokinlerden BAP'ın, kinetine göre daha etkili olduğu bildirilmektedir.

Olgun haldeki yaprakların kallus dokusunun oluşturulması için kullanıldığı Hu ve Yan (50) tarafından *Robinia pseudoacacia* L.'da yapılan bir çalışmada, kallus dokusunun oluşturulmasında temel besin ortamı MS' ye; NAA, BAP ve 2.4-D, 1.0 mg/l olarak eklenmiş, sürgün oluşumu ise BAP' ın yeniden eklenmesiyle gerçekleşmiştir. NAA'nın ise sürgün oluşumunda olumsuz bir etkiye sahip olduğu ve elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinin, ortama 0.1 mg/l IAA eklenmesiyle sağlandığına işaret edilmektedir.

Robinia pseudoacacia L.'da, Ha ve ark.(51) tarafından gerçekleştirilen başka bir araştırmada, 2 adet yaşlı ortetin sürgün kültürlerinden elde edilen internodal gövde parçaları MS ortamına BAP 2.5 mg/l olarak yalnız ve hem de 0.2 mg/l NAA ile birlikte eklenerek kültüre alındığında, sürgün oluşumunun gerçekleştiği ve elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinin 1/2 MS ortamına 0.2 mg/l IBA eklenmesiyle sağlandığı belirtilmektedir.

Zhang ve ark. (52) *Eucalyptus botryoides* Sm. internodlarında, kallus oluşumu ve sürgün gelişiminin MS besin ortamına 0.5 mg/l BAP ve 0.05 mg/l IBA'nın birlikte eklenmesiyle mümkün olduğunu ve sürgünlerin köklenmesi için de ortamda IBA'nın bulunmasının gerekli olduğunu bildirmektedirler.

Kumar ve Raman (53) *Eucalyptus camaldulensis* Dehn.'in embriyo dokuları üzerinde kallus oluşumunun modifize MS ortamına 2 mg/l 2.4-D'nin eklenmesiyle, sürgün oluşumunun da ortamda 5.0 mg/l BAP'ın bulunmasıyla gerçekleştiğini belirtmektedirler. Yine aynı araştırmacılar sürgünlerin köklendirilmesinin ortamda bitki büyüme düzenleyicisinin bulunmaması durumunda sağlanabildiğini de vurgulamaktadırlar.

Sürgün internodları kullanılarak, Lee ve Park (54) tarafından *Ailanthus altissima* Swingle.'da yapılan çalışmada, kallus oluşumunun MS temel besin ortamına 0.1 mg/l BAP ve 1.0 mg/l 2.4-D eklenmesiyle mümkün olduğu, sürgün oluşumunun ise en yüksek oranda, 0.5 mg/l BAP ve 0.01 mg/l

2.4-D'li ortamda gerekleŖtiđi belirtilmektedir. Elde edilen sürgünlerin ise bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı bir MS ortamında köklendiği bildirilmektedir.

1.2.2. Organ Kültürü İle İlgili Literatür zeti

Günümüzde doku kültürü teknikleri ile üretimde pratik ormancılığa uygulanabilirlik bakımından ve genetik stabiliteyi sağlamak açısından en çok kullanılan yöntem organ kültürüdür (4, 24, 26). Organ kültüründe sürgün oluŖumu ve bitki rejenerasyonunda; yapraklar, kotiledon ve hipokotil gibi embriyo parçaları, sürgün ve sürgün uçları, koltuk ve terminal tomurcukları gibi bitkinin deđiŖik kısımları materyal olarak kullanılmaktadır (55).

Christie (56) tarafından *Populus türleri* ve melezlerinde (*P. alba* L., *P. tremula* L., *P. tremuloides* Michx., *P. x canescens* (Aiton) Sm. ve *P. alba* x *P. glandulosa*'da) uç ve koltuk tomurcukları kullanılarak farklılaŖma elde edilmiŖtir.

Chalupa (57) *Populus türleri* (*P. tremula* L., *P. euramericana* cv. *robusta*, *P. nigra* var. *typica* ve *P. alba* L.)'nde, 10 - 20 yaŖındaki ortetlerden elde ettiği tomurcukların kültüre alınmasıyla sürgün oluŖumu elde edildiğini ve bu sürgünlerin turba perlit karıŖımından oluŖan bir ortamda kklendirildiğini belirtmektedir.

Bagnaresi ve Minotta (58)'nin *Populus alba* L., *Populus tremula* L. ve *Populus x canescens* (Aiton) Sm.'in koltuk tomurcuklarını eksplant olarak kullandıkları alıŖmalarında, sürgün çoğalması (proliferasyonu) safhasında en iyi sonuçların ortama BAP'ın 0.2 mg/l olarak eklenmesi ile gerekleŖtiđini bildirmektedirler. Köklenme safhasında ise en iyi sonuçlar; *P. alba* ve *P. x canescens*'de IBA ya da NAA 0.5 mg/l ya da 1.0 mg/l kullanıldığında alınmıŖ, *P. tremula*'da ise köklenme 1.0 mg/l olarak eklendiğinde gerekleŖmiŖtir.

Ahuja (59) *Populus tremula* L., *Populus tremuloides* Michx. ve her ikisinin hibritlerinin deđiŖik yaŖlı ortetlerinden elde ettiği; tomurcuk, internod, yaprak ve kök gibi eŖitli doku parçalarını kullanarak yapmıŖ olduğu araŖtirmasında, temel besin ortamı olarak WPM'den modifiye edilmiŖ ACM'yi kullanmıŖtır. Tomurcuk eksplantları 0.4 - 0.5 mg/l BAP'lı ortamda 20 mg/l adenin sülfat ile birlikte kullanıldığında, bazı genotiplerde 3 - 4 hafta sonra sürgün farklılaŖması grlmŖ, bu sürgün oluŖturun dokular, 3 - 4 hafta sonra 0.02 mg/l NAA'lı ortamda kültüre alınarak sürgün çoğaltılması

gerçekleştirilmiştir. 6-8 hafta ya da daha uzun bir süre sonunda kesilen sürgünler ACM + 0.5 mg/l IBA + 0.01 mg/l NAA ortamında, 8 -10 gün içinde köklenmişlerdir.

Ahuja (60) *P. tremula* L., *P. tremuloides* Michx. ve hibritleri üzerine yaptığı başka bir çalışmada, ACM temel besin ortamında ACM -1, ACM - 2 ve ACM - 3 olmak üzere üç ortam denemiştir. ACM-1 ortamını tomurcuk dormansisinin kırılması, ACM - 2 ortamını sürgün oluşumu, ACM - 3 ortamını ise köklendirme için kullanmıştır. Daha sonra ACM - 1 ortamını elimine ederek ACM - 2 ve ACM - 3 ortamlarını esas almıştır. Tomurcuk meristemlerinin kültüre alındığı çalışmada klonla bağlı olarak sürgün oluşum sürelerinde farklılıklar görülmüştür. Bazı klonların eksplantlarında sürgün farklılaşması 8 haftada gerçekleşirken, bazılarında bu süre 20 haftadan fazla olmuştur. Köklenmede de klonlara bağlı olarak % 70 - 90 arasında değişen oranlar elde edilmiştir. Ayrıca köklendirme için sterilize edilmiş topraklı bir karışım da kullanılmıştır.

Whitehead ve Giles (61) bazı *Populus* türleri (*P. nigra* L. "italica", *P. deltoides* x *P. nigra* ve *P. yunnanensis* Dode.) ile ilgili olarak yapmış oldukları araştırmalarında; modifiye MS ortamında 0.2 mg/l BAP ilavesiyle tomurcuk dormansisinin 4 hafta içerisinde kırıldığını bildirmektedirler. Tomurcuklarda sürgün çoğalmasını sağlamak için ise 0.1 mg/l BAP'ın ve 0.02 mg/l NAA'nın birlikte gerekli olduğunu vurgulamaktadırlar. Bu şekilde bir tomurcuk eksplantından 6 - 8 hafta içerisinde 120 - 220 sürgün elde edilebileceğini belirtmektedirler. Elde edilen sürgünler hem 0.01 mg/l BAP ve 0.001 mg/l NAA'lı ortamda ve hem de turba içeren bir toprak karışımında köklendirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca in vitro'da elde edilen sürgünler 5 mm'lik parçalara ayrılarak (en az bir nod taşıyan) yine kültüre alındığında 1 yıl içerisinde 1 tomurcuk eksplantından 10^6 (1000000) sayıda bitkinin elde edilebileceğine de işaret edilmektedir.

Populus cilicata Wall.'nın yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı, Mehra ve Chema (62) tarafından yapılan çalışmada, temel besin ortamı MS'ye BAP eklenerek sürgün çoğaltılması ve köklendirme gerçekleştirilmiştir.

Sakkaroz, zeatin, IAA ve ABA'nın adventif tomurcuk ve sürgün oluşumundaki etkisini belirlemek amacıyla Douglas (63) tarafından *Populus trichocarpa* x *Populus tacamahaca* hibridi üzerine yapılan bir araştırmada MS temel besin ortamında sakkarozun 10, 20, 30 mg/l ve daha yukarı seviyelerde eklenmesiyle, adventif sürgün oluşumunda anlamlı bir

etkisinin olduğu, ancak en iyi sürgün farklılaşmasının 30 g/l sakkarozda gerçekleştiği, bu seviyeden daha yukarıda ise sürgün oluşumunun engellendiği belirtilmektedir. Zeatin konsantrasyonunun 0 - 5 mg/l olarak artırılması da sürgün oluşumundaki sayıyı artırmıştır. IAA'nın yüksek dozlarda, ABA'nın ise düşük dozlarda eklenmesinin tomurcuk ve sürgün oluşumunu engellediğine işaret edilmektedir.

Xu (64) *Populus davidiana* Dode.'nın yaşlı bireylerinden elde ettiği koltuk ve uç tomurcuklarını, MS temel besin ortamında 0.5 mg/l BAP ve 0.02 ya da 0.05 mg/l NAA ile 20 mg/l arginin ekleyerek kültüre alındığında sürgün farklılaşmasının gerçekleştiğini, köklenmenin ise 0.3 - 0.8 mg/l IBA dozlarında % 77.8 oranında sağlandığını bildirmektedir. Yine araştırmacı, tomurcukların ortetlerden alınması için en uygun zamanın dormansi döneminin sonu, tomurcuk patlaması esnası olduğunu da belirtmektedir.

Rutledge ve Douglas (65) 12 ticari kavak klonunun sürgün uçları, meristem dokuları ve nodal segmentlerini başlangıç eksplantı olarak kullandıkları çalışmalarında, ortetlerin genotiplerinin, sürgün oluşumunda ve gelişmesinde besin ortamından daha fazla etkili olduğunu belirtmektedirler. Bu çalışmada temel besin ortamı olarak, modifiye MS, modifiye Anderson ve B5 ortamları kullanılmıştır. Test edilen 3 farklı sitokinininden (2IP, BAP ve zeatin) sürgün oluşumunda en etkilisinin BAP ve zeatin olduğu, kültürlerde sürgün veriminin sürgün ucunda % 52, nodal segmentde % 78 ve meristem ucunda % 20 olarak gerçekleştiğini ve sürgün üretiminde optimum oranın ise 0.25 mg/l BAP ve 1.0 mg/l zeatin dozlarında mümkün olduğunu vurgulamaktadırlar.

Sellmer ve ark. (66) 5 kavak klonunda MS ve WPM besin ortamlarını kullanarak sürgün uçlarını kültüre almışlardır. 5 klonun tamamı MS ortamında BAP, 0.1 - 0.25 mg/l dozlarında eklenerek kültüre alındığında hızlı bir sürgün çoğalması gösterdikleri halde, bu klonlardan birinde en fazla sürgün sayısı WPM ortamında elde edilmiştir. Tüm klonlardan elde edilen sürgünlerin, BAP'ın bulunmadığı ya da çok az oranda (0.02 mg/l) bulunduğu ortamlarda % 100 oranında köklendiği bildirilmektedir.

Coleman ve Ernst (67) yaptıkları çalışmada, *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh.'de sitokinin türünün ve genotipin, sürgün oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. WPM ortamından değiştirilerek elde edilmiş ortamda 16 farklı ortetden elde edilen internodal segmentler eksplant olarak kullanılmıştır. BAP, 2IP ve zeatin 0.25 - 4.0 mg/l arasında değişen 5 farklı dozda test edildiğinde, en etkili sitokininin zeatin olduğu belirlenmiştir. BAP

eklenen ortamlarda hızlı bir şekilde kahverengileşme ve çürüme olmuştur. En optimum adventif tomurcuk ve sürgün oluşumu 0.5 mg/l zeatin dozunda görülmüş, 3 genotipin eksplantları iyi gelişme göstermiş, diğer genotiplerde gelişme zayıf olmuştur. Oluşan sürgün miktarlarının genotipe bağlı olarak değiştiği, elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinin ortama 1.0 mg/l IBA eklendiğinde gerçekleştiğine de işaret edilmektedir.

Coleman ve Ernst (68) tarafından yine *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh.'de yapılan başka bir araştırmada, ortam olarak DKW kullanılarak, 4 ortamın in vitro'da elde edilmiş stabil sürgün kültürlerinin internodları kullanılarak zeatin dozunun ve genotipin sürgün oluşumundaki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; adventif sürgün oluşumu bakımından genotipe bağlı olarak farklılıklar olduğu ve en optimum adventif sürgün oluşumunun 1.0 mg/l zeatin dozunda gerçekleştiği belirtilmiştir. Sürgün uzaması bakımından ise, 0.25 mg/l zeatin dozunun daha etkili olduğu vurgulanmaktadır.

Chalupa (69)'nın *Tilia cordata* Mill.'da yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre; genç fideciklerin nodları, modifiye MS ortamında 0.2 - 0.6 mg/l BAP eklenerek kültüre alındığında, sürgün oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Sürgünler düşük tuz konsantrasyonu içeren ortamlara IBA'nın eklenmesiyle köklendirilmiştir. Aynı çalışmada bu çoğaltma tekniğinin 12 türde daha başarıyla uygulandığı bildirilmektedir.

Chalupa (70) tarafından yapılan başka bir araştırmada, *Tilia cordata* Mill. ve *Tilia platyphyllos* Scop.'ın da içinde yer aldığı 11 türde, genç fidanların nodal eksplantları kullanılarak MS, WPM ve GD ortamlarında başarılı bir şekilde sürgün çoğaltılması ve köklendirilmesinin gerçekleştirildiği belirtilmektedir.

Chalupa (71) yine bir diğer araştırmasında, *Quercus robur* L. ve *Tilia cordata* Mill.'da başlangıç eksplantı olarak 2 - 24 aylık fideciklerin nodlarını kullanmıştır. Test edilen 4 besin ortamı (GD, MS, BTM ve WPM) içerisinde en iyi gelişme her iki türde de BTM ve WPM ortamlarında görülmüştür. Ortamlara eklenen iki sitokinin; kinetin ve BAP içerisinde, kinetin sürgün oluşumunda etkili olmadığı belirtilmektedir. Her iki türde de en iyi sürgün gelişimi 0.2 - 1.0 mg/l BAP'lı ortamlarda da gerçekleşmiştir. Sürgünlerin köklenmesi ise 1/2 (GD, BTM ve WPM) ortamlarına IBA ve NAA birlikte eklenmesiyle 2 - 4 hafta içerisinde % 90 - 95 oranında gerçekleşmiştir.

Chalupa (72) tarafından yapılan başka bir çalışmada da sürgün çoğaltılması üzerine BAP ve thidiazuron adlı iki sitokinin etkisi, *Tilia cordata*

Mill., *Sorbus aucuparia* L. ve *Robinia pseudoacacia* L. türlerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak Thidiazuronda sitokin aktivitesinin BAP'a göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Elde edilen sürgünlerin düşük oranda oksin içeren ortamlarda köklendirildiğine de işaret edilmektedir.

Tilia cordata Mill.'da 15 yaşındaki iki ortetden elde edilen koltuk tomucuklarının 3 farklı kültür ortamında (IS, BTM ve WPM), 0.2 - 5.0 mg/l BAP eklenerek kültüre alındığı Youn ve ark. (73)'nin yaptığı bir çalışmada, sürgün uzaması ve çoğalması için en uygun BAP dozunun 0.2 mg/l olduğu bildirilmekte, köklenmenin ise 1/2 IS ortamında 3.0 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA bulunduğu % 63.6 oranında gerçekleştiği belirtilmektedir.

Youn ve ark. (74) *Tilia amurensis* Rupr. fideciklerinin tomurcuklarını eksplant olarak kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada, BAP'ın sürgün oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Besin ortamı olarak MS ve IS'nin kullanıldığı bu çalışmada, en iyi sonuç 1.0 mg/l BAP'da elde edilmiştir. Ancak sürgün çoğalması için en iyi dozun 0.2 mg/l BAP olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişiminin ise MS ortamında, IS ortamına göre daha iyi olduğu ve köklenmenin 1/2 MS ortamına 0.3 mg/l IBA eklenmesiyle % 91.7 oranında gerçekleştiğine işaret edilmektedir.

Youn ve Ohba (75) *Tilia amurensis* Rupr.'de yaptıkları başka bir çalışmada ise, eksplant olarak 15 yaşındaki ortetlerin tomurcuklarını kullanmıştır. Besin ortamı olarak IS, MS ve WPM kullanılarak 5 farklı BAP dozu test edilmiştir. Sonuç olarak en iyi BAP dozunun, IS ve WPM ortamlarında 1.0 mg/l MS ortamında 0.5 mg/l olduğu, sürgün çoğalması için ise 0.2 mg/l BAP'ın daha optimum olduğu belirlenmiştir. Ayrıca en iyi köklenmenin % 83.3 oranında 1/2 MS + 3.0 mg/l IBA ortamında gerçekleştiği bildirilmektedir.

Chalupa (76) *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L.'nin da içinde yer aldığı değişik türlerde, genç ve yaşlı ortetlerin sürgünlerinin nodal parçalarını kullanarak yaptığı çalışmada; BAP ve Thidiazuron adlı iki sitokininin sürgün oluşumundaki etkisini belirlemiş, sonuçta her iki sitokininin de sürgün oluşumunda yeterli bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Oluşan sürgünlerin in vitro koşullarda köklendirildiği ve köklenme oranının türlere göre % 22 - 94 arasında değiştiği de belirtilmektedir.

İde ve Yamamoto (77) *Quercus acutissima* Carr.'da iki aylık fideciklerin nodlarını modifiye IS ortamında 4 farklı BAP dozunda kültüre almışlardır. Sürgün çoğalması 0.8 ve 1.2 mg/l BAP dozlarında, en iyi sürgün uzaması

0.4 mg/l BAP dozunda gerekleŒmiŒtir. Sürgünlerin köklendirilmesinin ise in vitro ortamında baŒarıyla gerekleŒtirildiđi bildirilmektedir.

Ide ve Yamamoto (78) *Quercus serrata* Thunb.'da gerekleŒtirdikleri benzer bir alıŒmada, nodların kültüre alınmasından 5 hafta sonra koltuk sürgünleri elde edilmiŒ, mevcut sürgünlerin in vitro koŒullarda köklenmesi % 44.4 oranında gerekleŒmiŒtir.

Meier - Dinkel (79) *Quercus robur* L. ve *Q. petraea* (Matt.) Liebl.'da hem 10 aylık fideciklerin, hem de 25 - 55 yaŒları arasındaki 4 adet klonun sürgün uçlarını kültüre almıŒtır. Ortam olarak GD besin ortamını kullanan araŒtırıcı, sürgün uçlarını 0.5 mg/l BAP dozunda test etmiŒ, bir nodal segmentden 3 kültür ortamı deđiŒiminden sonra 4.1 yeni segment elde etmiŒtir. Bu Œekilde 10000'in üzerinde mikrosrgnler elde ederek, bunlardan 2000 tanesinin kklenip yaŒamasını sađlamıŒtır.

Volkaert ve ark. (80) *Quercus robur* L. fideciklerinden elde ettikleri sürgün uçları ve nodları sürgün oluŒturma bakımından karŒılaŒtırmıŒlardır. WPM temel besin ortamının kullanıldığı alıŒmada, sonuç olarak nodal eksplantların, sürgün ucu eksplantlarına göre daha hızlı sürgün geliŒimi gösterdiğini belirlemiŒlerdir.

San - Jose ve ark. (81) *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.'da 2 - 5 aylık fidecikler ve 55 yaŒındaki bir klonun kütük sürgünlerinden elde ettikleri sürgün ucu, nodal ve bazal eksplantları 5 farklı ortamda (GD, H, SH, Gupta ve Durzan) test etmiŒler ve en iyi geliŒmeyi GD ortamında elde etmiŒlerdir. Genel olarak uç, nodal ve bazal eksplantlar, kültürde aynı tepkiyi gstermiŒlerdir. Sürgün oluŒumu için kültür ortamlarına, BAP 0.5 mg/l olarak eklenmiŒtir. Köklenme için sürgünler ge bireylerinkinde 0.5 g/l IBA solüsyonunda 6 dakika, yaŒlı ortetin sürgünlerinde ise 1 g/l IBA solüsyonunda 2 dakika bekletildikten sonra in vitro koŒullarda kklendirilmiŒtir. Köklenme yüzdesinin, yaŒlı materyalde % 39, ge materyallerde ise % 57 - 100 arasında olduğu vurgulanmaktadır.

Sengi (82) *Quercus crispula* Blume.'da 25 yaŒındaki bir ortetin koltuk tomurcuklarını WPM ortamında 0.2 mg/l BAP dozunda kültüre alarak elde ettiği sürgünleri, 500 mg/l IBA solüsyonuna 3 saniye batırarak in vitro ortamında kklendirdiğini bildirmektedir.

Quercus suber L.'de Manzanera ve Pardos (83) yapmıŒ oldukları araŒtırmada, 3 aylık fideciklerin ve 30 - 40 yaŒındaki ortetlerin sürgünlerinin nodal parçalarını ve uç tomurcuklarını kullanımıŒlardır. alıŒma sonuçlarına göre; sürgün geliŒimi için en iyi BAP dozunun 0.1mg/l olduğu ortaya

konmuştur. Köklenme yüzdesi bakımından yaşlı ortetlerden alınan eksplantlarda oluşan sürgünlerde köklenme yüzdesi daha düşük olmuştur.

Johnson ve Walker (84) *Quercus lobata*'nın mikrovegetatif olarak çoğaltılmasını sağlamak için yapmış oldukları çalışmalarında test ettikleri üç ortamdan (BTM, GD ve WPM) ikisinin (BTM ve GD) sürgün oluşumunda daha iyi etkiyi sağladığını ve 0.3 mg/l BAP dozunun sürgün oluşumunda en optimum olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ballester ve Meier-Dinkel (85) *Quercus robur* L. ve *Q. petraea* (Matt.) Liebl.'da farklı ülkelerdeki laboratuvarlarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; GD ortamı kullanılarak 0.5 mg/l BAP dozunda elde edilen çeşitli klonlara ait sürgünlerin, IBA solüsyonuna batırıldıktan sonra in vitro ortamına alındığında daha iyi köklenmenin olduğunu bildirmekte ve yine bu laboratuvarlarda enfeksiyon oranının % 3-80 arasında değiştiğini belirterek, yaşlı materyalin sürgünlerinde köklenmenin de çok zayıf olduğuna işaret etmektedirler.

Dorion ve ark. (86) bazı *Ulmus* türleri (*U. effusa* Willd., *U. campestris* Mill., *U. pumila* L. ve *U. americana* L.)'nin in vitro'da çoğaltılması için yaptıkları çalışmalarda, çeşitli besin ortamlarının (MS, Heller, Morel ve Wetmore) kombinasyonu ile oluşturdukları yeni bir besin ortamı kullanmışlardır. Nodal eksplantların koltuk sürgünü geliştirmesi ortamda sitokinin ya da oksin bulunmadığında gerçekleşmiştir. Ortama sitokinin eklenmesi, yoğun bir kallus oluşumuna neden olmuştur. Sürgünlerin köklendirilmesi hormonların bulunmadığı ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

Steril şartlarda çimlendirilmiş tohumların epikotillerinin kullanıldığı, Mezzetti ve ark.(87) tarafından *Ulmus carpinifolia* Gleditsch.'da yapılan bir çalışmada, üç farklı besin ortamı (MS, WPM ve DL) denenmiştir. Sürgün oluşumunu sağlamak için BAP ortamlara 0.5 mg/l dozunda eklenmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için ise 0.1 ya da 0.5 mg/l NAA dozları kullanılmıştır.

Biondi ve ark. (88) *Castanea sativa* Mill.'da yaşlı ortetlerin kütük sürgünlerinin koltuk tomurcuklarını, 0.5 mg/l BAP'ın eklendiği MS ve SH ortamlarında kültüre alarak sürgün farklılaşmasını sağlamışlardır.

Vieitez ve Vleitez (89) ise yine *Castanea sativa* Mill.'da yaptıkları araştırmalarında in vitro'da bitki rejenerasyonu için fideciklerin nodlarını başlangıç eksplantı olarak kullanmışlardır. MS, Heller ve QP ortamlarının kullanıldığı çalışmada, sürgün çoğaltılması için en uygun BAP dozunun 0.1 - 0.2 mg/l olduğunu belirlemişlerdir. Köklendirme için test edilen IBA ve

NAA'dan IBA'nın, köklenmede daha etkili olduğu bulunmuştur. 3.0 mg/l IBA, % 58 oranında köklenme sağlamıştır.

Vieitez ve ark. (90) mantarlara karşı dayanıklı olan *Castanea sativa* x *C. crenata* Siebold & Zucc. hibrit klonlarından aldıkları kütük sürgünlerinin sürgün uçlarını ve nodal parçalarını modifize MS ortamında kültüre almışlardır. Denemeler sonucunda sürgün çoğalması için optimum BAP dozunun 0.2 mg/l olduğu belirlenmiştir. In vitro'da elde edilen sürgünler köklendirme amacıyla 0.5 g/l IBA solüsyonunda 15 dakika, 1.0 g/l IBA solüsyonunda ise 2 dakika bekletilerek hormonsuz bir ortamda kültüre alınmışlardır. Bunun sonucunda köklenmenin klona bağlı olarak, % 27 - 93 arasında gerçekleştiği bildirilmektedir.

Castanea sativa x *C. crenata* Siebold & Zucc. hibridiyle ilgili olarak Ballester ve ark. (91) tarafından yapılan bir başka çalışmada, 30 yaşındaki bir bireyin dormansi döneminde seçilen ışısız bırakılmış ve ışıklandırmaya tabi tutulmuş dalları, iklim odalarında sürdürülerek elde edilen sürgünlerin sürgün uçları ve nodları kullanılmış ve sürgün oluşturma durumları karşılaştırılmıştır. Sonuçta, ışıktan yoksun bırakılmış dalların sürgünlerinin in vitro' da daha iyi büyüme tepkisi gösterdiği anlaşılmıştır.

Sanchez ve Vieitez (92) *Castanea sativa* Mill. ve *C. sativa* x *C. crenata* Siebold & Zucc.'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 5 farklı klonun dip kısımlarından alınan sürgünler ile tepe dallarından alınan sürgünlerin in vitro'da gösterdikleri morfolojik tepkiyi araştırmışlardır. Temel besin ortamı olarak GD'nin kullanıldığı çalışmada BAP, başlangıç ortamına 0.5 mg/l, sürgün çoğaltılması için ise 0.2 mg/l olarak eklenmiştir. Çalışmanın sonucunda in vitro'da gerek sürgün oluşturma ve gerekse köklenme bakımından dip sürgünlerinin aynı ağacın tepe dallarından alınan sürgünlere göre daha iyi bir kapasiteye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Perinet ve Tremblay (93) 5 adet *Alnus* spp. türünün mikrovegetatif yolla üretilmesini sağlamak için yaptıkları denemelerde, yaklaşık 60000 adet sürgünün in vitro'da üretilmesini sağlamışlardır. Bu çalışmada temel besin ortamı olarak MS kullanılmış, BAP, 0.5 - 1.2 mg/l dozlarında test edilmiştir. Yaklaşık 15000 adet sürgünün 1/2 MS'ye 0.2 - 1.0 mg/l IBA eklenerek köklendirildiği belirtilerek, bunların da % 99 - 100 oranında yaşama başarısı gösterdiğine işaret edilmektedir.

Barghıçı (94)'nin 8 yaşındaki ortetlerin sürgün uçları ve koltuk tomurcuklarını kullanarak *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel.'da yapmış olduğu araştırmasında, kinetin ve BAP'ı hem tek başına hem de NAA ile birlikte MS

ortamını kullanarak test etmiştir. Sonuçta, kinetinin sürgün oluşumunda etkili olmadığı BAP'ın 1.0 mg/l dozunun etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi, hem 1/2 MS besin ortamına 1.0 mg/l IBA eklenerek in vitro'da, hem de sürgünlerin bazal kısımları 625 mg/l IBA solüsyonunda 24 saat süreyle bekletilerek in vivo'da, topraklı karışımda gerçekleştirilmiştir.

Ahuja (95) *Fagus sylvatica* L.'da 70 yaşında ve daha yaşlı 3 ortetden elde ettiği tomurcuk eksplantlarını modifiye WPM ortamında kültüre almıştır. BAP, kinetin, NAA, IAA ve 2.4-D'nin çeşitli doz ve kombinasyonlarda test edildiği çalışmada, tomurcukların yaklaşık % 50'sinin 10 - 12 hafta sonra çok zayıf bir gövde farklılaşması gösterdiği ve yaşlı ortetlerden elde edilen eksplantlarla *Fagus sylvatica*'nın in vitro'da çoğaltılmasının güç olduğu belirtilmektedir.

Gebhardt ve Weisberger (96) tarafından *Fagus sylvatica* L.'da yapılan bir başka çalışmada, 100 yaşından daha fazla yaştaki bir ortetin tepesinin üç farklı bölgesinden, ayrıca kök sürgünleri ile kütük sürgünlerinden elde edilen sürgün uçlarının in vitro'da rejenerasyon kapasitesi belirlenmeye çalışılmıştır. 0.2 mg/l BAP ilavesiyle GD besin ortamının kullanıldığı çalışmada, kültürlerin yaşama ve büyümesinde, kök ve kütük sürgünlerinden elde edilen sürgün uçlarının daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Minocha ve ark. (97) *Betula papyrifera* Marsh.'da fideciklerin nodlarını eksplant olarak kullandıkları çalışmalarında sürgün çoğaltılması için MS, köklendirme için WPM ve B5 ortamlarını kullanmışlardır. Sürgün çoğalması için BAP ve zeatin 1 - 5 mg/l olarak ortamlara eklenmiş ve sürgünlerin köklendirilmesi için ise 0.2 mg/l IBA yeterli olmuştur.

Sato ve ark. (98) *Betula platyphylla* var. *japonica* Hara'nın yaprak saplarını kullanarak adventif tomurcuk oluşumu ve sürgün gelişimini, BAP'ın 0.7 mg/l olarak eklendiği IS ortamında sağlamışlardır. Köklenme IAA eklenen ortamda gerçekleşmiştir.

İde (99)'nin yapmış olduğu bir yayında, *Betula grossa* S.et Z.'da dormansi döneminde alınan tomurcuklarla kurulan denemelerde, sürgün oluşumu için BAP'ın tek başına yeterli olmadığı, sürgünlerin sararıp öldüğü ve GA3'in de ortamda bulunmasının gerekliliğinden söz edilmektedir. MS ve IS besin ortamlarının kullanıldığı bu çalışmada, en iyi köklenmenin ise hormon bulunmayan ortamlarda gerçekleştiği belirtilmektedir.

Struve ve Lineberger (100) ise *Betula papyrifera* Marsh.'da yapmış oldukları araştırmalarında, yaşlı ortetlerden elde ettikleri sürgünlerin sürgün

uçlarını eksplant olarak kullanmışlardır. WPM besin ortamının kullanıldığı bu çalışmada, tomurcuk ve sürgün oluşumu için BAP, ortama 2.5 mg/l, sürgün çoğalması için ise 1.0 mg/l olarak eklenmiştir. Elde edilen sürgünler, in vivo' da turba + vermikülit karışımında köklendirilmiştir.

Betula celtibrata'nın fidanlarından elde edilen internodların kullanıldığı, Perez ve Postigo (101) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tomurcuk ve sürgün oluşumunun MS ortamına 20 gün süreyle 0.6 mg/l BAP, sürgün uzamasının ise 20 gün süreyle 0.2 mg/l BAP eklenmesiyle mümkün olduğu, köklenmenin ise ortama 0.2 mg/l IBA eklenmesi durumunda, 7 gün içerisinde gerçekleştiğinden bahsedilmektedir.

Ide ve Yamamoto (102)'nin yaptıkları araştırmada Betula maximowicziana Regel.'nin 17 yaşındaki bir bireyinden, dormansi döneminde aldıkları tomurcukları, in vitro'da kültüre etmek için kullanmışlardır. Modifize MS ve modifize Anderson ortamlarının kullanıldığı çalışmada, sürgün oluşumu için BAP ve 2.4-D ayrı ayrı ve birlikte test edilmiştir. MS ortamında gelişme olmamış, Anderson ortamında ise olumlu gelişmeler olmuştur. BAP'ın 1.6 mg/l olarak eklendiği ortamlarda sürgün gelişimi ve köklenme optimum şekilde gerçekleşmiştir.

Vijayakumar ve ark. (103)'nin Betula uber (Ashe) Fern.'de 25 yaşındaki bir ortetden dormansi döneminde aldıkları tomurcukları eksplant olarak kullanarak yaptıkları çalışmalarında, in vitro'da rejenere bitkiler elde etmişlerdir. Modifize MS ortamının kullanıldığı çalışma için BAP ve IBA'nın 0.6 mg/l ve 0.05 mg/l olarak test edildiği ve oluşan sürgünlerin köklendirilmesi için bir toprak karışımının kullanıldığı belirtilmektedir.

Chalupa (104) Salix spp., Sorbus aucuparia L. ve Robinia pseudoacacia L.'nin 3 yaşındaki fidanlarının nodal parçalarını ve sürgün uçlarını başlangıç eksplantı olarak kullanarak çok sayıda rejenere bitki elde etmiştir. Ortam olarak modifize GD ve modifize MS ortamlarının kullanıldığı araştırmada, BAP ve kinetin hem yalnız ve hem de IBA ve NAA ile kombine edilerek test edilmiştir. Sonuçta; Salix türlerinde en iyi sürgün gelişiminin 1/2 GD ve GD'de hormon eklenmediğinde, köklenmenin 0.1 - 0.2 mg/l IBA'lı ortamda, Sorbus aucuparia'da en iyi sürgün gelişiminin 0.6 - 0.8 mg/l BAP ve 0.05 mg/l IBA'lı ortamda, köklenmenin 1/2 GD ortamında 0.3 mg/l IBA ya da 0.3 mg/l NAA eklendiğinde, Robinia pseudoacacia'da ise en iyi sürgün gelişiminin 0.4 - 0.6 mg/l BAP ve 0.05 mg/l IBA'lı ortamda, köklenmenin 1/2 GD ortamında 0.3 mg/l IBA ya da 0.3 mg/l NAA eklendiğinde mümkün olduğunu ortaya koymuştur.

Robinia pseudoacacia L.cv. " Jaszkeri " 'de 15 yaşındaki bir bireyden elde edilmiş gövde ve kök çeliklerinin köklendirilmesi sonucunda elde edilen fidanlarını tomurcuklarını kullanarak, Barghchi (105) bir çalışma yapmıştır. MS besin ortamına BAP ve NAA'nın tek tek ve birlikte eklenmesiyle, en iyi sürgün oluşumunun 1.0 mg/l BAP ortamında gerçekleştiği belirlenmiş ve sürgünler 1/2 MS ortamına 1.0 - 2.0 mg/l IBA eklenerek köklendirilmiştir.

Keresztesi (106) *Robinia pseudoacacia* L.'nin 4 farklı kültüründe MS ortamını kullanarak yaptığı araştırmada, gerek sürgün oluşumu ve gerekse köklenme bakımından aynı hormon içeriklerinde kültürarlara bağlı olarak gelişme farklılıklarının bulunduğundan sözetmektedir.

Yine *Robinia pseudoacacia* L. ile ilgili olarak Davis (107)'in yaptığı çalışmada, 5 farklı klondan dormansi döneminde elde edilen tomurcuklar kültüre alınmıştır. Sonuçta yalnızca 2 klonda çoğalmanın sağlandığı ve diğer 3 klonda her hangi bir gelişme olmadığı, ayrıca köklenme üzerinde de klonal etkinin bulunduğu belirlenmiştir.

Morus alba L. ile ilgili olarak Ohyama ve Oka (108) yapmış oldukları çalışmada, yaşlı ortetlerden dormansi dönemi ve vejetasyon dönemi içerisinde elde ettikleri tomurcukları 1.0 mg/l BAP'ın eklendiği MS ortamında kültüre alarak sürgün gelişimi sağlandığını, köklenmenin ise hormonun bulunmadığı MS ortamında 30 gün sonra gerçekleştiğinden bahsetmektedirler.

Ohyama ve Oka (109) diğer bir çalışmalarında, *Morus* spp.'larda tomurcukların büyümesi için sitokinlerin gerekli olduğunu, BAP'ın zeatinden daha çok etki gösterdiğini, kinetinin ise beklenen etkiyi yapmadığını bildirmektedirler.

Sharma ve Thorpe (110) *Morus alba* L.'nin 3-4 yaşındaki fidanlarının nodal parçalarını in vitro'da MS ortamına 0.5 mg/l BAP ekleyerek kültüre aldıklarında optimum sürgün çoğalmasını elde etmişlerdir. Sakkarozun 30 g/l dan daha az ve daha çok eklenmesi sürgün büyümesini engellemiştir. Sakkarozun 30 g/l olarak eklendiği ortamlarda eksplantlarda birer sürgün oluşumunun olduğu fakat 6 hafta sonra sararıp öldükleri belirtilmektedir. MS + 0.5 mg/l BAP ortamında sürgün oluşumu ile birlikte kök gelişimi de gözlenmiştir.

Yadav ve ark. (111) *Morus nigra* L.'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında BAP ve kinetini sürgün oluşumu için denemişler, 0.1 - 1.0 mg/l arasındaki dozları test ettiklerinde, sürgün çoğalması için 1.0 mg/l BAP'ın etkili olduğunu, kinetinin ise sürgün oluşumunu sağlamadığını ortaya

koymuşlardır. MS besin ortamında 12 yaşındaki ortetin sürgün uçları ve nodal parçalarının kültüre alındığı araştırmada, kültürden 4 hafta sonra üretilen sürgünlerin, 0.25 mg/l IBA ortamında köklendiği de bildirilmektedir.

1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA içeren modifize MS ortamında, *Prunus avium* L.'un yaşlı ortetlerinin dallarından ya da kök sürgünlerinden alınan tomurcuklar kültüre alındığında, hızlı bir sürgün oluşumunun gerçekleştiği, Riffaud ve Cornu (112) tarafından yapılan bir araştırmada belirtilmektedir. 4 - 5 hafta içerisinde her bir eksplant klona bağlı olarak 4 - 15 arasında sürgün oluşturmuştur. Kesilmiş mikroçelikler, önce IBA solüsyonuna batırılarak, 1/5 MS ortamında hormon eklenmeksizin kültüre alınmış ve köklendirilmiş ve köklenme ise % 67 - 100 oranında elde edilmiştir.

Cornu ve Chaix (113) yine *Prunus avium* L.'da yaptıkları benzer bir araştırmada yaşlı ortetlerden elde ettikleri son yıllık sürgünlerin tomucuklarını kullanarak modifize MS ya da QP ortamına 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l BAP ekleyerek iyi bir sürgün oluşumu elde etmişlerdir. Oluşan sürgünler IBA'nın eklendiği MS ortamında köklendirilmiştir.

Meier-Dinkel (114)'in *Prunus avium* L.'da yaptığı aynı nitelikli çalışmada, toplam 23 klondan elde ettiği tomurcukları, MS ortamına 1.0 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l GA3 ekleyerek sürgün oluşumu elde etmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi 1/3 MS + 0.5 mg/l IBA - 2.0 mg/l NAA ortamında sağlanmıştır. Köklenme klona bağlı olarak % 70 - 95 arasında gerçekleşmiştir.

Curir ve ark. (115) *Eucalyptus gunii* Hook.f. ve *E. stuartiana* F.V.M.'da fideliklerin nodlarını, Fossard ortamına 0.2 mg/l BAP ekleyerek kültüre aldıkları araştırmalarında, yüksek çoğalma oranı elde etmişler ve köklendirmeyi sağlamak için ise IBA kullanmışlardır.

Sita ve ark. (116) *Eucalyptus grandis* (Hill.) Maiden'de 4 yaşındaki fidanların nodlarını kullanarak yaptıkları çalışmada sürgün çoğalmasında BAP'ın etkili olduğunu kinetin ve 2IP'nin kullanılmasıyla sürgünlerde kahverengileşme görüldüğünü, köklenmenin ise IAA'lı ortamda gerçekleştiğini bildirmektedirler.

Eucalyptus camaldulensis Dehn.'de Kumar ve Ayyapan (117)'in yaptıkları bir çalışmada ise, fideliklerin nodlarını kullanarak hızlı bir sürgün çoğalması sağlamışlardır Modifize bir MS ortamında BAP eklenmesiyle sürgün çoğalması, bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı bir ortamda ise sürgünlerin köklenmesi mümkün olmuştur.

Rao (118) *Eucalyptus treticornis* Sm.'de gerçekleştirdiği araştırmasında, nodal eksplantları kültüre alarak sürgün çoğalmasını ve köklenmeyi elde etmiştir. Modifize MS ortamına 1.0 mg/l NAA, 0.2 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP eklenmesi sürgün gelişimine olumlu etki yapmıştır. Köklenmenin ise 1/2 MS ortamında mümkün olduğu belirtilmektedir.

Warrag (119) *Eucalyptus grandis* (Hill.) Maiden. hibritlerinde 5 yaşındaki bireylerin koltuk tomurcuklarını, 0.5 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA'lı MS ortamında kültüre alarak tomurcukların gelişmesini, 0.6 mg/l BAP'lı ortamda ise yüksek oranda çoğalma elde etmiştir. Sürgünlerin köklenmesi 1/4 MS'de % 98 oranında gerçekleşmiştir.

Aynı tür ile ilgili olarak Warrag ve ark. (120)'nin yaptığı başka bir çalışmada in vitro'da üretim tekniği, yaşlı ortetlerden alınan eksplantlar için de denenmiştir. Yaşlı ortetlerden alınan nodların % 100'ü enfekte olurken, boğulan sürgünlerin nodları eksplant olarak kullanıldığında enfeksiyon % 40 olarak belirlenmiştir.

Trindade ve ark. (121) *Eucalyptus globulus* Labill. (121)'un 12 yaşındaki bir ortete ait sürgün nodlarının gelişiminde sitokinin etkisini belirlemek için BAP ve kinetini test etmiş ve kinetinin sürgün gelişiminde etkili olmadığını ortaya koymuşlardır. İn vitro'da elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için ise ortamda oksin eklenmesine gerek olmadığı yine çalışma sonucunda ortaya konmuştur.

Van-Standen ve Le-Roux (122) soğuğa dayanıklı *Eucalyptus* spp. türleri ve hibritlerinde fidelik ve değişik yaşlı ortetlerin nodlarını 0.1 mg/l BAP'lı modifize MS ortamında kültüre alarak sürgün büyümesi, 0.2 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA'lı ortama naklederek sürgün çoğalmasını elde etmiştir. Köklenme 2.0 mg/l IBA'lı 1/2 MS ortamında gerçekleşmiştir.

Acer platanoides L.'de sürgün uçları BAP ve IBA'lı modifize MS ortamında kültüre alınarak, 6 hafta içerisinde sürgün çoğalması sağlanmıştır. Cheng (123)'nin yaptığı bu çalışmada sürgünlerin köklendirilmesinin ise IBA'lı ortamda gerçekleştirildiğine işaret edilmektedir.

Juglans regia L. ile ilgili olarak Steffen ve Millikan (124) yaptıkları yayında, yaşlı ortetlerden elde ettikleri meristem dokularının çoğaltılmasında başarı sağlanamadığından ve endogenik fenolik maddelerin oksidasyona neden olmasının önemli bir sorun olduğundan bahsetmektedirler.

Kai ve ark. (125) *Corylus avellana* L.'nin genç fidanlarının koltuk tomurcuklarını kullanarak gerçekleştirdikleri araştırmalarında, 5.0 mg/l BAP

+ 0.1 mg/l GA3 + 0.01 mg/l NAA'lı MS ortamında, sürgün oluşumu bakımından en iyi sonucu elde etmişlerdir. Köklenmede ise 0.1 mg/l IBA dozu iyi gelişme sağlamış, 0.5 mg/l IBA dozu anormal kök oluşumlarına neden olmuştur.

Sutter ve Barker (126) değişik yaşlı fidanların tomurcuklarını kullandıkları *Liquidambar styraciflua* L.'da, 0.2 ve 1.0 mg/l BAP'lı WPM ortamında sürgün çoğalması, 0.5 mg/l IBA ortamında köklenme elde etmiştir.

Burger ve ark. (127) *Paulownia tomentosa* Steud.'da yaşlı ortetlerin sürgünlerinin nodlarını modifiye MS ortamında kültüre aldıklarında, 5.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA'lı dozlarda sürgün oluşumu gerçekleşmiş, oluşan sürgünler hem in vitro'da hem de in vivo'da köklendirilmiştir.

Preece ve ark. (128) *Fraxinus* spp. türlerinde, WPM + 5.0 yada 10.0 mg/l BAP ortamında sürgün uçlarını (genç ve yaşlı bireylerin) kültüre alarak elde ettikleri sürgünleri, hem in vitro'da hem de in vivo'da köklendirmişlerdir.

Elaeagnus angustifolia L.'nın yaşlı bir bireyinin tomurcuklarını kullanarak, Economou ve Spanoudaki (129)'nin gerçekleştirdikleri çalışmada, BAP sürgün oluşumunda kinetinden daha etkili olmuş, köklenme ise oksin bulunmayan ortamda gerçekleşmiştir.

Song ve ark (130) *Paulownia catalpifolia* ile ilgili yayınlarında, sürgün oluşumunda üç ortamdan (MS, WPM ve BTM) BTM'nin en iyi sonucu verdiğini, en iyi sürgün oluşumunun 0.2 mg/l BAP dozunda, kök oluşumunun ise 4.0 mg/l IBA dozunda gerçekleştiğini bildirmektedirler.

Garton (131) *Salix* spp. türlerinde hibritler ve klonlar arasında, in vitro' da sürgün oluşturma bakımından, aynı ortamda önemli farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur.

Yunnita ve ark. (132) *Cercis canadensis* var. *alba* L.'da farklı sitokininlerin sürgün oluşumuna etkilerini araştırmış ve BAP'ın daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Kök gelişimi ve oluşumu bakımından da IBA'nın NAA'ya göre daha etkili olduğu bildirilmektedir.

Masubuchi (133) ise *Aesculus x carnea* Hayne. üzerine yaptığı çalışmada, BAP ve IBA'yı ortama birlikte eklemenin sürgün çoğalması sağladığını, köklenmenin ise IBA'lı ortamda AC'nin de eklendiğinde gerçekleştiğini belirtmektedir.

Gymnospermae'lerde *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl. (134) dışında, organ kültürü ile üretim Angiospermae'lerde olduğu gibi, genç ve yaşlı materyalden elde edilen eksplantlarla değil, embriyo ve embriyodan

elde edilen kotiledon, hipokotil ve epikotil eksplantları üzerinde oluşturulan adventif tomurcukların sürgüne geliştirilmesi ve köklendirilmesi esasına dayanmaktadır.

Kathryn ve Washer (135) *Pinus radiata* D.Don'da kotiledon ve hipokotilleri, Mott ve Amerson (136) *Pinus monticola* Dougl.'da embriyo ve kotiledonları, Von Arnold (137) *Picea abies* (L.) Karst.'da embriyoları, Pletikapic ve ark. (138) *Pinus nigra* Arnold.'da embriyoları, Rumary ve Thorpe (139) *Picea glauca* (Moench.) Voss. ve *Picea mariana* (Mill.) BSP' da epikotilleri, Patel ve Thorpe (140) *Picea engelmannii* Parry'de embriyo, kotiledon, hipokotil ve epikotilleri, Harry ve ark. (141) *Thuja occidentalis* L.' de embriyoları, Pulido ve ark. (142) *Pinus canariensis* Sweet ex K. Spreng.' de kotiledonları, Webb ve ark. (143) *Pinus strobus* L.'da embriyo, kotiledon, hipokotil ve epikotilleri, Chang ve ark.(144) ise *Pinus virginiana* Mill.'da embriyoları başlangıç eksplantı olarak kullanarak rejenere bitkiler elde ettiklerini bildirmektedirler.

1. 2.3. Embriyo Kültürü İle İlgili Literatür Özeti

Embriyo kültürü orman ağacı türlerinde katlama problemlerini ortadan kaldırmak için kullanılabilir (31).

Bulard ve Monin (145) *Fraxinus excelsior* L.'in embriyo kültüründe besin ortamına hormon eklemeksizin, 30 g/l glukozun eklenmesiyle bitki rejenerasyonu sağlandığını araştırma sonunda ortaya koymuşlardır.

Yüce (146) *Olea europea* L.'da tohumlardan izole ettiği embriyoları, hiç bir katlamaya tabi tutmaksızın IAA ve GA3 eklenen ortamlarda kültüre aldığı normal çimlenme ve bitki rejenerasyonunun gerçekleştiğini bildirmektedir.

Vieitez ve Vieitez (147) *Castanea sativa* Mill.'nin embriyo uç kısımlarını kültüre alarak yaptıkları çalışmalarında, 2.0 mg/l BAP'ın eklendiği ortamlarda koltuk sürgünlerinin oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu sağlamışlardır. Yine araştırmacılar başka bir yayınlarında (148) bu bitkiciklerin nodal eksplantlarını kullanarak koltuk sürgünleri elde etmişlerdir.

Bellarosa (149) *Quercus suber* L. embriyolarını 2.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l NAA eklenen ortamlarda kültüre almış ve embriyolar üzerinde kallus oluşumu gerçekleştirmiştir. Araştırmanın sonucunda normal bitkicikleri

üretmek için ortamdan NAA'nın uzaklaştırılmasının gerekli olduğundan söz edilmektedir.

Deidda ve ark. (150) tarafından *Quercus suber* L. embriyoları ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada, 2.25 mg/l BAP eklenen ortamlarda embriyoların iki hafta içerisinde çimlendiği, 1 - 1.5 ay sonra da sürgün çoğalmasının gerçekleştiği bildirilmektedir.

Srivastava ve Steinhauer (151) *Quercus lebanii* Oliv'de yaptıkları araştırmada ise embriyoları farklı sitokin ve oksin dozlarında kültüre almışlardır. IAA, 2IP ve 40 g/l sakkarozun eklendiği ortamda embriyoların % 42'sinde bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

Sommers ve ark. (152) *Juglans regia* L.'da embriyo kültürü için en iyi ortamların, 5.0 mg/l BAP'ın eklendiği MS ve WPM ortamları olduğunu, embriyoların çimlenmesiyle elde edilen sürgün uçlarından koltuk sürgünlerinin çoğaltılmasının ise BAP ve IBA'lı ortamda gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır.

Caruso (153) tarafından *Juglans nigra* L.'da yapılan başka bir çalışmada, sitokin ve oksin birlikte kullanılarak embriyodan sürgün çoğaltılması ve bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

Jay-Allemand ve Cornu (154) *Juglans regia* L. embriyoları ile gerçekleştirdikleri araştırmalarında, epikotil ve kök gelişiminin ortama 20 g/l sakkaroz eklenmesiyle sağlandığını bildirmektedirler.

Cossio ve Minolta (155) *Juglans regia* L.'da yaptıkları çalışmalarında, kültüre edilen embriyoların büyümesi ve gelişmesi üzerinde BAP'ın istenmeyen bir etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler.

Ahuja (95) *Fagus sylvatica* L.'da BAP ve NAA'yı birlikte ortama ekleyerek embriyoları kültüre almış ve bazı embriyolarda sürgün ve kök farklılaşması elde etmiştir.

Chalupa (76) *Sorbus aucuparia* L.'da yaptığı araştırmada, tohumlardan izole edilen embriyoların, MS besin ortamına 0.4 - 0.6 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA eklenerek kültüre alındığını ve 6 - 8 hafta içerisinde sürgün oluşumunun başladığını bildirmektedir.

Sharma ve Thorpe (110) *Morus alba* L.'nın in vitro'da nodal segmentler kullanılarak çoğaltılması için, embriyoları, 30 g/l sakkarozun eklendiği ortamlarda kültüre alarak çimlendirmişlerdir.

Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolardan yararlanılarak, elde edilen kallus dokuları üzerinde somatik embriyo oluşumu ile bitki rejenerasyonu da; *Eucalyptus grandis* (Hill.) Maiden'de Warrag (119), *Tilia*

amurensis Rupr.'de Kim ve ark. (156), Robinia pseudoacacia L.'da Merkle ve Wiecko (157), Magnolia spp.'da Merkle ve Wiecko (158), Quercus robur L. ve Tilia cordata Mill.'da Chalupa (159), Fraxinus spp.'da Preece ve ark. (128) tarafından gerçekleştirilmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Titrek Kavak İle İlgili Bitkisel Materyal

Denemelerde kullanılan değişik yaşlı (Tablo 1) ortetlere ait sürgünler, Şebinkarahisar Orman İşletme Müdürlüğü, Merkez Bölgesi Asarcık serisinde doğal olarak yayılış gösteren titrek kavak alanlarından elde edilmiştir. Ortetler fenotipik seleksiyona tabi tutularak seçilmiştir. Tablo 1'de verilen O8 kodlu genç fidanlara ait materyal ise Karadeniz Teknik Üniversitesi kampüsünden sağlanmıştır.

2.1.2. Kafkas İhlamuru İle İlgili Bitkisel Materyal

Denemelerde kullanılan tohumlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi kampüsü içerisinde bulunan ortetlerden toplanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Materyalin Alınma Zamanı

2.2.1.1. Titrek Kavakta Materyalin Alınma Zamanı

Sürgünlerin alınma işlemlerinin tümü vejetasyon döneminin dışında yapılmıştır. Sürgün örnekleri 10 Ekim 1992'de 2 adet ortetden (Tablo 1'de O1 ve O2); 14.2.1993'de 5 adet ortetden (Tablo 1'de O3, O4, O5, O6 ve O7) toplanmıştır. Genç ortetlere ait sürgünler ise 04 Ocak 1993'de alınmıştır. 10 cm uzunluğunda kesilen sürgünler, polietilen torbalar içinde piknik soğutucularına konularak, kullanım yerlerine ulaştırılmış ve deneysel çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Tablo 1 : Titrek Kavakta Sürgün Alınan Ortetlere Ait Bilgiler

Ortet Kodu	Ortet Yaşı	Sürgünlerin Alındığı Tarih	Yükseklik (m)
O1	20	10.10.1992	1550
O2	30	10.10.1992	1550
O3	20	14.02.1993	1550
O4	27	14.02.1993	1550
O5	15	14.02.1993	1550
O6	15	14.02.1993	1550
O7	18	14.02.1993	1550
O8	2	04.01.1993	50

2.2.1.2. Kafkas İhlamurunda Materyalin Alınma Zamanı

Kafkas İhlamurunda tohum olgunluğu, brahtelerin açık yeşilden açık kahverengine, tohumun beyazdan kahverengine dönüşmesiyle anlaşılmaktadır (160).

İhlamur türlerinde tohum, Ağustos ve Eylül başında olgunlaşmadan önce toplanıp ekilirse iyi sonuç alınabilmektedir. Aksi halde hemen katlamaya alınmalıdır.

Tohumlar, kahverengine dönüşmeden yeşil halde, 25 - 30 Ağustos 1992, 4 - 6 Ağustos 1993 ve 25 - 30 Ağustos 1993'de üç farklı tarih süresinde toplanarak, deneysel çalışmalarda kullanılıncaya kadar +4°C'de, polietilen torbalar içerisinde saklanmışlardır.

2.2.2. Besin Ortamlarının Saptanması ve Hazırlanması

Bitki doku kültürlerinde dikkate alınması gereken faktörlerden birtanesi de çeşitli mineral besin elementleri ve vitaminleri içeren besin ortamlarıdır. (161). Günümüze kadar bir çok sentetik besin ortamı geliştirilmiştir. Bu temel besin ortamları, bitkilerin isteklerine göre modifiye edilebilmektedir. Bu çalışmada; Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen MS (162) ve Llyod ve McCown tarafından geliştirilen WPM (Woody Plant Medium) (163) adlı iki temel besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamlarının içerikleri ve hazırlanış şekilleri Tablo 2, ve 3'de verilmiştir.

Tablo 2 : MS ve WPM Temel Besin Ortamlarının İçerikleri

Bileşimleri	Ortamın MS (mg/l)	Adı WPM (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	400
KNO ₃	1900	--
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	22.3
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	--	556
K ₂ SO ₄	--	990
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI	0.83	--
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	--
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3	37.3
Nikotinik asit	0.5	0.5
Thiamin. HCl	0.5	1.0
Pyridoxin. HCl	0.5	0.5
Inositol	100	100
Glycin	2.0	2.0

1 litre MS besin ortamı hazırlamak için Tablo 3'de verilen stok eriyiklerden; stok - 1'den 50 ml, stok - 2'den 5 ml, stok - 3'den 5 ml, stok - 4'den 5 ml alınarak 1 litrelik behere konulmuştur.

1 litre WPM besin ortamı hazırlamak için Tablo 3'de verilen stok eriyiklerden; stok - 1'den 100 ml, stok - 2'den 100 ml, stok - 3'den 10 ml ve stok - 4'den 10 ml alınarak 1 litrelik behere konulmuştur.

Tablo 3: MS ve WPM Temel Besin Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Stok Eriyikleri

Besin Maddeleri	MS (mg/l)	Besin Maddeleri	WPM (mg/l)
STOK ERİYİK - 1		STOK ERİYİK - 1	
NH ₄ NO ₃	33000	NH ₄ NO ₃	4000
KNO ₃	38000	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5560
CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	CaCl ₂ .2H ₂ O	960
MgSO ₄ .7H ₂ O	7400	KH ₂ PO ₄	1700
KH ₂ PO ₄	3400	MgSO ₄ .7H ₂ O	3700
STOK ERİYİK - 2		STOK ERİYİK - 2	
KI	116	K ₂ SO ₄	9900
H ₃ BO ₃	1240	STOK ERİYİK - 3	
MnSO ₄ .4H ₂ O	4460	H ₃ BO ₃	620
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720	MnSO ₄ .H ₂ O	2230
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	50	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
CuSO ₄ .5H ₂ O	5	CuSO ₄ .5H ₂ O	25
CoCl ₂ .6H ₂ O	5	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	25
STOK ERİYİK - 3		FeSO ₄ .7H ₂ O	5560
FeSO ₄ .7H ₂ O	5560	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7460
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7460	STOK ERİYİK - 4	
STOK ERİYİK - 4		Thiamin.HCl	100
Nikotinik asit	100	Nikotinik asit	50
Thiamin.HCl	100	Pyridoxin.HCl	50
Pyridoxin.HCl	100	Inositol	10000
Inositol	20000	Glycin	200
Glycin	400		

Her iki ortamın hazırlanmasında, ortamlara ayrıca istenilen miktarlarda sakkaroz ve bitki büyüme düzenleyicileri (hormonları) eklenerek ortamın hacmi 1l'ye tamamlanmıştır. Bu işlemlerden sonra ortamların pH'ı manyetik karıştırıcı yardımıyla 0.1 N NaOH ve 0.1 N HCl ilave edilerek ayarlanmıştır. pH ayarlaması yapılan ortamlar, içerisinde agar bulunan erlenmayerlere boşaltılmıştır. Ortamlar su banyosunda agarın ortama tamamiyle karışması için, şeffaf bir renk alınca kadar kaynatılmıştır. kaynama işleminin ardından elde edilen eriyik, kullanılacak ortamın niteliğine göre 15 x 150 mm'lik kültür tüplerine yada 60 x 120 mm'lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Kültür tüplerinin ve kaplarının ağızları alüminyum folye ile sıkıca kapatılmıştır. Kültür kaplarının alüminyum folye ile kapatılmasından sonra ayrıca, sterilizasyon esnasındaki sıcaklığa dayanıklı kapaklarla da üzerleri

kapatılmıştır. Ağızları kapatılan tüpler ve kültür kapları bu aşamadan sonra otoklavda sterilizasyona tabi tutularak, kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Köklendirme denemelerinde kullanılmak üzere, 1/2 (yarım kuvvetde) ve 1/4 (çeyrek kuvvetde) MS ve WPM ortamı hazırlamak için de yukarıda anlatılan işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Ancak burada stok eriyiklerden alınan miktarlar, 1/2 oranında yada 1/4 oranında alınarak 1l.'ye tamamlanmıştır.

2.2.2.1. Sakkaroz ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Seçimi

Sakkaroz odunsu bitki türlerinde, sürgün oluşumu üzerinde büyüme ve farklılaşmanın desteklenmesi için en iyi karbonhidrat olarak nitelenmektedir (164).

Bitki dokularının mikrovejetatif yöntemlerle çoğaltılmasında, bitki büyüme düzenleyicilerinin çok büyük önemi vardır. Bunların bir bölümü doğal olarak oluşabileceği gibi (IAA), bir bölümü de sentetik olarak (2.4-D, BAP) elde edilebilmektedir (165, 166).

Çeşitli bitki dokularının çoğaltılmasında, sürgün oluşumunu sağlamak için, çoğunlukla sitokininler kullanılmaktadır. BAP ve kinetin en çok kullanılan sitokininlerdir. Bazı durumlarda ise zeatin de etkili olmaktadır. Sürgünlerin köklendirilmesi ise, oksinlerin düşük dozlarıyla sağlanabilmektedir. Sentetik oksinler IBA ve NAA'nın genel olarak, IAA ve 2.4-D'den bu bakımdan daha etkili olduğu belirtilmektedir (167).

2.2.2.1.1. Titrek Kavakta Denenen Dozlar

Denemelerde; Sakkaroz, BAP, kinetin, IBA ve NAA değişik doz ve kombinasyonlarda kullanılmıştır.

Kültüre alınan tomurcuk eksplantlarında, sürgün oluşumu ve gelişimi ve bu sürgünlerin köklendirilmesi için, MS ve WPM ortamlarına eklenen sakkaroz, sitokinin sitokinin + oksin ve oksin + oksin doz ve kombinasyonları ve ortamları katılaştırmak için kullanılan agar miktarları tablo 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da verilmiştir.

Tablo 4, 5, 6, 7 ve 8'de verilen tüm sakkaroz, sitokinin, sitokinin + oksin denemelerinde kültüre alınan tomurcuk eksplantları Tablo 1'de verilen ve O1 ve O2 olarak kodlandırılan, iki ortetin sürgünlerinden alınmıştır.

Tablo 4 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Sakkaroz ve Agar Miktarları

Sakkaroz (g/l)	10	20	30	40
Agar (g/l)	7	7	7	7

Tablo 5 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları

BAP (mg/l)	0.2	0.5	1.0	2.0
Sakkaroz (g/l)	30	30	30	30
Agar (g/l)	7	7	7	7

Tablo 6 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP + IBA Dozları , Sakkaroz ve Miktarları

BAP (mg/l)	0.2	0.5	1.0	2.0
IBA (mg/l)	0.1	0.1	0.1	0.1
Sakkaroz (g/l)	30	30	30	30

Tablo 7 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Kinetin Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları

Kinetin (mg/l)	0.2	0.5	1.0	2.0
Sakkaroz (g/l)	30	30	30	30
Agar (g/l)	7	7	7	7

Tablo 8 : Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Kinetin + IBA Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları

Kinetin (mg/l)	0.0	0.2	0.5	1.0	2.0
IBA (mg/l)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sakkaroz (g/l)	30	30	30	30	30
Agar (g/l)	7	7	7	7	7

Tablo 9 : O3, O4, O5, O6 ve O7 ve O8 No lu Ortetlerde Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları

BAP (mg/l)	0.2	0.5
Sakkaroz (g/l)	30	30
Agar (g/l)	7	7

Tablo 10 : Sürgünlerin Köklenmesi İçin Ortamlara Eklenen IBA + NAA Dozları, Sakkaroz ve Agar Miktarları

IBA (mg/l)	0.2	0.5	1.0	2.0
NAA (mg/l)	0.1	0.1	0.1	0.1
Sakkaroz (g/l)	15	15	15	15
Agar (g/l)	8	8	8	8

In vitro'da elde edilen sürgünleri, in vitro dışında in vivo'da, direk olarak toprak karışımına alınarak köklendirilmesi için de denemeler kurulmuştur. Bunun için sürgünler üç farklı uygulamadan geçirilmiştir.

1. Uygulamada; sürgünlerin dip kısımları % 0.1'lik IBA solüsyonuna batırılarak toprak karışımına alınmışlardır.
2. Uygulamada; sürgünlerin dip kısımları % 0.3'lük IBA solüsyonuna batırılarak toprak karışımına alınmışlardır.
3. Uygulamada; sürgünler herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın toprak karışımına alınmışlardır.

2.2.2.1.2. Kafkas İhlamurunda Denenen Dozlar

Denemelerde; sakkaroz, BAP ve IBA'nın farklı dozları kullanılmıştır. 25 - 30 Ağustos 1992 tarihleri arasında toplanan tohumlardan izole edilen embriyolar; Tablo 11, 12 ve 13'de verilen sakkaroz, BAP ve IBA dozlarında kültüre alınmışlardır.

Tablo 11 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen Sakkaroz Dozları ve Agar Miktarları

Sakkaroz (g/l)	10	20	30	40
Agar (g/l)	7	7	7	7

Tablo 12 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen BAP Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları

BAP (mg/l)	0.1	0.2
Sakkaroz (g/l)	30	30
Agar (g/l)	7	7

Tablo 13 : Embriyolarda Fidecik Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortamlara Eklenen IBA Dozları Sakkaroz ve Agar Miktarları

IBA (g/l)	0.1	0.2
Sakkaroz (g/l)	30	30
Agar (g/l)	7	7

4 - 6 Ağustos 1993 ve 25 - 30 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumlardan izole edilen embriyolar; 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar eklenen ortamlarda kültüre alınmışlardır.

2.2.3. Sterilizasyon

2.2.3.1. Besin Ortamlarının Sterilizasyonu

Ortam sterilizasyonu için önerilen minimum zaman süresi ortamın hacmine göre değişmektedir. Bu süre 20 - 50 ml hacim için minimum 15 dakika, 50 - 75 ml hacim için minimum 20 dakika olarak belirlenmiştir (168).

Kültür tüpleri ya da kültür kaplarına konan ortamlar, ağızları kapatılarak içerdikleri ortam hacimlerine göre, 121°C sıcaklıkta ve 1.05 kg/cm² (15 - 20 psi) basınçta 15 - 20 dakika süreyle otoklavda, sterilize edilmiştir.

2.2.3.2. Bitkisel Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu

Eksplantların sterilizasyonu, odunsu bitki türlerinin doku kültürlerindeki en önemli problemlerden birisidir. Özellikle bitkisel materyal olgun ağaçlardan seçildiğinde, çoğu kez enfeksiyon (kontaminasyon) daha fazla olmaktadır (30). Eksplantların yüzeysel sterilizasyon süreleri ise, eksplantın türüne ve tazeliğine göre değişmektedir (169).

Dokuların sterilize edilmesinde en çok kullanılan yüzeysel sterilizasyon maddeleri; NaOCl (sodyum hipoklorit) ve CaOCl (kalsiyum hipoklorit) dir (170).

2.2.3.2.1. Titrek Kavaktan Elde Edilen Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu

Daha önceden değişik yaşlı ortetlerden kesilerek + 4°C'de saklanmakta olan sürgünler, deterjan katkılı normal çeşme suyu ile iyice yıkandıktan sonra, temizlenip durulanmıştır. Bu ön yıkama işleminden sonra sürgünler, uç tomurcuğu ve 2 - 3 adet yan tomurcuklar taşıyacak şekilde kesilmiştir. Bu kısa sürgün parçaları, steril çalışma kabini içerisinde yüzeysel sterilizasyon için hazırlanmış olan % 70'lik alkol solüsyonu ve % 3'lük NaOCl içinde tutulmuştur. Bunu takiben, 3 kez ve 5 er dakika süreyle steril saf sudan geçirilerek yüzeysel sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

2.2.3.2.2. Kafkas Ihlamuru Tohumlarının Yüzeysel Sterilizasyonu

İlk önce, tohum kabukları bistüri yardımıyla soyularak, endospermier açığa çıkartılmıştır. Bu endospermier, steril çalışma kabini içerisinde yüzeysel sterilizasyon için hazırlanmış olan % 70'lik alkol solüsyonunda 3 dakika, % 3'lük NaOCl solüsyonunda 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra 3 kez ve 5 er dakika süreyle steril saf sudan geçirilerek, yüzeysel sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

2.2.3.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu

Steril çalışma kabini, kültür aşılama çalışmalarına başlamadan önce, 30 dakika süreyle çalıştırıldıktan sonra % 96'lik alkolle silinmiştir. Eksplant sterilizasyonu için kullanılan cam malzeme, otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Çeşitli amaçlarla kullanılan tüm cam malzeme; otoklavda sterilizasyondan önce 150° C'de etüvde, 1 saat süreyle bekletilmiştir.

Eksplantları kültüre almada kullanılan pens, iğne ve bistüriler, çalışmaya başlamadan önce alkolle silinip ateşten geçirilmiştir.

2.2.4. Materyalin Kültüre Alınması

2.2.4.1. Titrek Kavak Materyalinin Kültüre Alınması

Sterilize edilen sürgünlerdeki uç ve yan tomurcuk eksplantlarının önce pulları temizlenmiştir. Bu tomurcuklar bir kaç yaprak taslağı taşıyan odunsu

doku ile birlikte 6 -8 mm uzunluğunda kesilmiş ve içinde steril besin ortamı bulunan kültür tüpleri içerisinde kültüre alınmışlardır. Eksplantlar, bazal kısımları ortam içerisinde kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Kùltürler gelişme durumlarına göre 4 - 6 haftada bir taze steril besin ortamlarına aktarılmıştır. Gelişme olan eksplantlara daha fazla alan sağlamak için taze ortamlara aktarılırken, kültür kapları kullanılmıştır.

2.2.4.2. Kafkas İhlamuru Materyalinin Kültüre Alınması

Sterilize edilmiş endospermilerin içinden, steril iğneler kullanılarak embriyolar izole edilmiştir (çıkarılmıştır). Embriyolar, içinde steril besin ortamı bulunan kültür tüplerinin içine, hipokotilleri ortam içinde kalacak şekilde düşey olarak kültüre alınmıştır.

2.2.5. Ortam pH' sının Ayarlanması

Genel bir kural olarak ortamın pH'sı sterilizasyondan önce 5.0 - 6.0 arasında bir değere getirilmektedir. Normalde, 5.0 den daha düşük pH değeri iyi sonuç vermemektedir (171).

Denemelerde kullanılan besin ortamlarının pH'sı doku kültürlerinde genel olarak kullanılan 5.6 ± 0.2 değerine ayarlanmıştır

2.2.6. Kültür Koşulları

Eksplantların kültre alınmasından sonra; gelişebilmeleri için uygun çevre koşullarında bulundurulmaları gereklidir. Kùltürlerin gelişebilmeleri için, sıcaklık ışık ve rutubetin belli oranlarda uygulanması gerekmektedir. Orman ağacı doku kültürleri için inkübasyon sıcaklıkları, 20 - 28°C arasında değişmekle birlikte, çoğu kùltürlerde sıcaklık ortalama olarak 25°C civarında uygulanmaktadır (172). Işık şiddeti genel olarak, 1000 - 5000 luks arasında değişmekte (46, 60, 73), rutubet ise % 70 seviyesinde tutulmaktadır. (60, 73, 95). Inkübasyon ortamı olarak; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, 3000 luks ışık şiddeti, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşullu ve % 70 rutubete ayarlı iklim dolabı kullanılmıştır.

2.2.7. Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler

2.2.7.1. Titrek Kavakta Yapılan Ölçüm ve Gözlemler

2.2.7.1.1. Eksplantlardaki Gelişme ve Sürgün Oluşumu

Eksplantların kültüre alınmasından itibaren; gelişme durumları; renkleri, canlılıkları ve sürgün oluşumları kültürler taze ortamlara aktarıldıkça gözlenmiştir.

Sürgün oluşumu görülen kültür ortamlarında, denemelerin başlangıcından 10 hafta sonra; explantlarda oluşan sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve bu sürgünlerdeki nod sayıları belirlenmiştir. Bu kültürler 4 - 6 haftada bir parçalanarak yeni ortamlara aktarılmıştır.

2.2.7.1.2. Sürgünlerin Köklendirilmesi

Sürgünlerin köklendirilmesi için in vitro'da ve in vivo'da olmak üzere iki farklı yöntem denenmiştir.

In vitro'da köklendirmede temel besin ortamının 1/2 ve 1/4 lük oranları kullanılmıştır.

In vivo'da köklendirmede sürgünler 4 : 1 : 1 oranında hazırlanmış, yaprak çürüğü : kum : perlitten oluşan sterilize edilmemiş toprak karışımına alınmışlardır. Şaşırtma sonrası 20 - 22°C sıcaklık, normal gün ışığı ve % 80 - 90 rutubet içeren kontrollü çevre şartları kullanılmıştır.

Köklendirme ortamlarına alınan sürgünlerde, köklenme başlangıcı ve 4. haftaya kadar köklenme durumu gözlenerek, köklenme oranları belirlenmiştir.

2.2.7.2. Kafkas İhlamurunda Yapılan Gözlem ve Ölçümler

Embriyoların kültüre alınmasını takibeden ilk haftadan itibaren, 30 gün süreyle kültür ortamlarındaki gelişme durumları izlenmiştir. Kültür başlangıcından 30 gün sonra embriyoların gelişerek fidecik oluşturduğu ortamlardaki bu fideciklerin epikotil ve kök uzunlukları ölçülmüştür.

2.2.8. Köklü Fideciklerin Şaşırtılması

2.2.8.1. Titrek Kavak Fideciklerinin Şaşırtılması

In vivo'da köklenmiş fidecikler, köklenme süresince tabi olduğu şartlara uyum sağlayarak sera şartlarına alınmışlardır.

In vitro'da köklenmiş bitkicikler 2 : 1 : 1 oranında hazırlanmış turba : kum : perlit karışımına şaşırtılarak üç hafta süreyle 20 - 22°C sıcaklık, normal gün ışığı ve % 80 - 90 rutubet içeren kontrollü çevre şartlarında üç hafta bekletildikten sonra, sera koşullarına alınmışlardır.

2.2.8.2. Kafkas Ihlamuru Fideciklerinin Şaşırtılması

Embriyoların kültüre alımasından 30 gün sonra, epikotil ve kök farklılaşmasının gerçekleştiği fidecikler, kök budaması yapılarak, 1 : 1 oranında hazırlanmış turba : kum karışımına şaşırtılmıştır. 20 - 22°C sıcaklık, normal gün ışığı ve % 80 - 90 rutubet içeren kontrollü çevre şartlarında üç hafta bekletildikten sonra, sera koşullarına alınmışlardır.

2.2.9. Denemelerin Kurulması ve Değerlendirilmesi

2.2.9.1. Titrek Kavak İle İlgili Denemelerin Kurulması

Her bir deneme 2 tekrarlı olarak kurulmuş ve toplam olarak en az 40 (40 - 45) eksplant kullanılmıştır.

2.2.9.2. Kafkas Ihlamuru İle İlgili Denemelerin Kurulması

Her bir deneme 2 tekrarlı olarak kurulmuş ve toplam olarak en az 25 (25 - 30) adet embriyo kullanılmıştır.

2.2.9.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler sonucunda elde edilen veriler, varyans analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. F testi ile 0.01 yanılmayla kontrol edildikten sonra, farklı grupların tesbitinde Duncan testi 0.05 ve 0.01 yanılma esas alınarak kullanılmıştır. Sayı değerlerinde $X + 0.5$ dönüşümü uygulanmıştır (173).

3. BULGULAR

3.1. Titrek Kavak İle İlgili Bulgular

3.1.1. Sakkaroz Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi

Tablo 1'de verilen O1 ve O2 nolu ortetlere ait tomurcuk eksplantları, tomurcuk pulları temizlenerek, birkaç genç yaprak taslağının bulunduğu odunsu doku ile birlikte kültüre alınmışlardır.

Tüm sakkaroz dozlarında (10, 20, 30 ve 40 g/l), hem WPM ve hem de MS ortamlarında eksplantlar kültüre alındıktan sonra 7 - 10 gün içerisinde, dormansi kırılmış ve genç yaprak taslakları büyümeye başlamıştır. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra tüm sakkaroz dozlarında gelişme gösteren yapraklarda kallus oluşumları ve sararmalar görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1 : WPM ve MS Ortamlarında 10, 20, 30 ve 40 g/l Sakkaroz Dozlarında 3 Hafta Sonra Gelişme Durumu (İkişerli Gruplardan Soldakiler WPM, Sağdakiler MS ortamlarındaki Gelişmeleri Göstermektedir)

Eksplantların kültüre alınmasından 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde, tüm sakkaroz dozlarında gelişmelerin, WPM ortamlarında, MS ortamlarına kıyasla daha iyi olduğu, 20 ve 30 g/l sakkaroz dozlarının daha iyi gelişim sağladığı görülmüştür. Taze ortamlara aktarılan eksplantlarda 10. haftaya kadar gözlemlere devam edilmiş, ancak sürgün gelişimi gerçekleşmemiş ve büyüme gösteren yaprak taslakları sararmış ve ölmüştür.

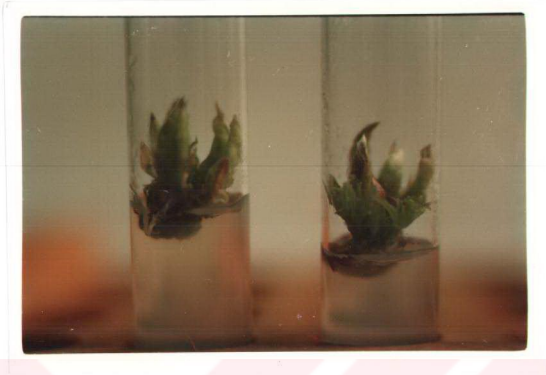
3.1.2. BAP Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi

Tablo 1'de belirtilen O1 ve O2 nolu ortetlere ait tomurcuk eksplantları BAP'ın 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l olarak eklendiği MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır.

MS ve WPM ortamlarında eksplantlarda 7 - 10 gün içinde tomurcuk dormansisi kırılmıştır. Genç yaprak taslaklarının odunsu doku ile birleşim noktalarında beyaz renkli kallus oluşumu görülmüştür. MS ortamlarına konan eksplantlarda, genç yapraklar gelişmesine karşın bu yapraklarda sararma ve kahverengileşmeler olmuştur. WPM ortamlarına konan eksplantlardan bazılarında 3 hafta sonra tomurcuklarda genç yaprak taslaklarının odunsu doku ile birleşim noktalarında beyaz renkli kallus oluşmuş ve bu bölgelerden sürgün farklılaşması ve sürgün çoğalmasının başladığı gözlenmiştir. Eksplantların kültüre alınmasından 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde WPM ortamlarındaki eksplantlarda sürgün farklılaşmasının devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 2). MS ortamlarında genç yaprak taslaklarının büyümesine karşın, sürgün farklılaşması görülmemiş, yapraklarda sararmalar ve kahverengileşmeler olmuştur (Şekil 3).

Kültür başlangıcından 10 hafta sonra yapılan gözlem ve ölçümlerde; MS ortamlarında sürgün farklılaşması görülmemiştir. WPM ortamlarında ise, BAP dozlarında sürgün sayısında, boylarında ve sürgünlerdeki nod sayılarında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. BAP dozlarındaki artış, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayılarında değişime neden olmuş (Şekil 4 ve 5) ve eksplantlarda görülen beyaz renkte kallus oluşumunu artırmıştır. Gözlem ve ölçüm sonucunda elde edilen değerler Tablo 14'de verilmiş ve Şekil 6, 7, 8 ve 9'da gösterilmiştir.

Elde edilen veriler arasında BAP dozlarına göre farklılık bulunup bulunmadığını belirlemek için varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 15'de verilmiştir.



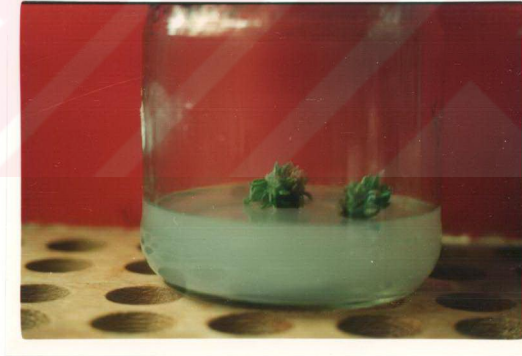
Şekil 2 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Eksplantlardaki Gelişme Durumu



Şekil 3 : MS + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Eksplantlardaki Gelişme Durumu



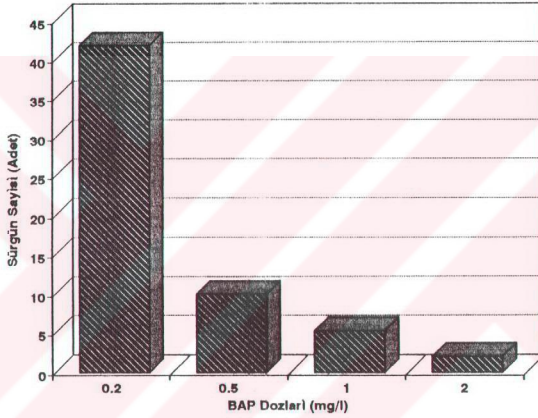
Şekil 4 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Kültürden 10 Hafta Sonra Sürgün Gelişimi



Şekil 5 : WPM + 2.0 mg/l BAP Ortamında Kültürden 10 Hafta Sonra Sürgün Gelişimi

Tablo 14 : Farklı BAP Dozlarında Kültüre Alınan Eksplantlardaki Gelişme Durumları (Kültür Başlangıcından 10 Hafta Sonra)

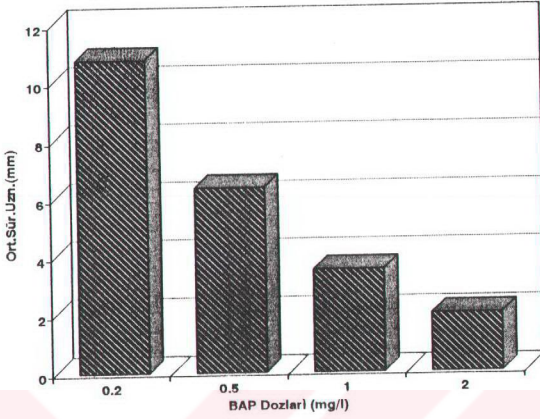
Ortam No	BAP Dozları (mg/l)	Bir Eksp. İçin Ort. Sür. Say. (Adet)	Max. Sür. Uz. (mm)	Min. Sür. Uz. (mm)	Ort. Sür. Uz. (mm)	Ort. Nod. Say. (Adet)
1	0.2	41.85	15.0	8.0	10.78	2.0
2	0.5	10.00	10.0	4.0	6.36	2.0
3	1.0	5.20	8.0	2.0	3.53	1.34
4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.00



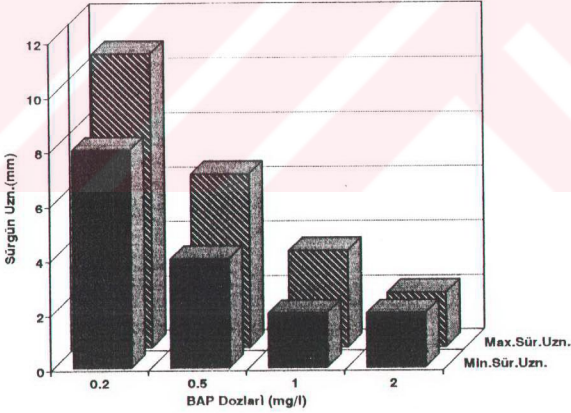
Şekil 6 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Sürgün Sayısına Etkisi

Tablo 14 ve Şekil 6 incelendiğinde görüleceği gibi, en yüksek ortalama sürgün sayısı 41.85 ile 0.2 mg/l BAP eklenen ortamlarda görülmüştür. Bunu 10.0 ile 0.5 mg/l BAP dozu izlemiştir. BAP dozunun artmasıyla birlikte 1.0 mg/l BAP' da sürgün sayısı 5.20 olarak gerçekleşirken, 2.0 mg/l BAP ortamında ortalama sürgün sayısı 2.0 olarak belirlenmiştir.

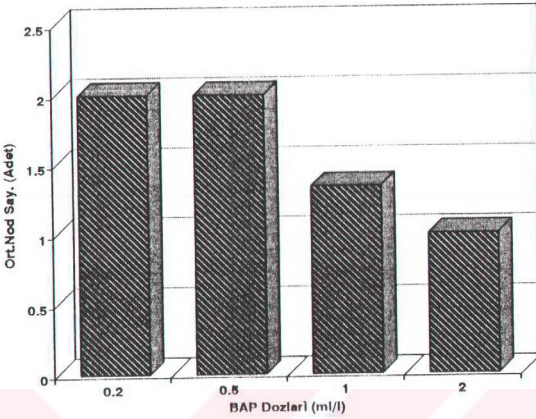
Aynı durum sürgün uzunluğu için de söylenebilir. Ortalama sürgün uzunluğu en iyi, 10.78 mm ile 0.2 mg/l BAP'ın eklendiği ortamda olmuş, bunu sırasıyla 6.36 mm ile 0.5 mg/l BAP, 3.53 mm ile 1.0 mg/l BAP. ve 2.0 mm ile 2.0 mg/l BAP dozları izlemiştir. (Tablo 14, Şekil 7).



Şekil 7 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Ortalama Sürgün Uzunluğuna Etkisi



Şekil 8 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunluğuna Etkisi



Şekil 9 : WPM Ortamındaki Farklı BAP Dozlarının Ortalama Nod Sayısına Etkisi

Maksimum ve minimum sürgün uzunlukları 15.0 mm ve 8.0 mm ile en iyi düzeyde 0.2 mg/l BAP' da ölçülmüştür. Bunu sırasıyla 10 mm ve 4.0 mm ile 0.5 mg/l BAP, 8.0 mm ve 2.0 mm ile 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mm ve 2.0 mm ile 2.0 mg/l BAP dozları izlemiştir (Tablo 14, Şekil 8).

Kültür başlangıcından sonra eksplantlarda oluşan sürgünlerdeki nod sayılarında da BAP dozuna göre farklılıklar olmuştur. BAP dozları 0.2 mg/l' dan 2.0 mg/l'a arttıkça sürgün boylarının kışalmasına paralel olarak nod sayılarında düşüş olmuştur. En fazla nod sayısı 0.2 mg/l ve 0.5 mg/l BAP dozlarında 2.0 olarak belirlenmiştir. 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP dozlarında, nod sayılarında azalma olmuş, ortalama nod sayısı sırasıyla 1.34 ve 1.00 olarak sayılmıştır (Tablo 14, Şekil 9).

BAP dozları arasında sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayıları bakımından oluşan farklılıkların, istatistiksel olarak kontrolünü yapmak için varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15 incelendiğinde görüleceği gibi sürgün boyu, sürgün sayısı ve nod sayısı bakımından kuvvetli düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Dozlar arasında bulunan farklılıklar Duncan Testi ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 15 : WPM Ortamında Farklı BAP Dozlarındaki Eksplantlarda Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

İncelenen Özellik	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F-Oranı	Olasılık	Duncan Testi Sonuçları**			
							II	III	IV	
Sürgün Sayısı	Gruplar ar.	76.729	3	25.576	28.456	.0000	I	2	2	2
	Gruplar içi	16.178	18	.898			II		0	1
	Toplam	92.907	21				III			0
Sürgün Uzunluğu	Gruplar ar.	606.060	3	202.020	68.643	.0000	I	2	2	2
	Gruplar içi	217.785	74	2.943			II		2	2
	Toplam	823.846	77				III			1
Nod Sayısı	Gruplar ar.	1.547	3	.515	22.081	.0000	I	0	2	2
	Gruplar içi	1.868	80	.023			II		2	2
	Toplam	3.415	83				III			1

I = 0.2 mg/l BAP

II = 0.5 mg/l BAP

III = 1.0 mg/l BAP

IV = 2.0 mg/l BAP

** 0 = İstatistikli düzeyde önemli farklılık belirlenemmiştir.

1 = Fark 0.05 yanılma ile önemlidir.

2 = Fark 0.01 yanılma ile önemlidir.

Sürgün sayısı bakımından; 0.2 mg/l BAP dozu diğer dozlar göre 0.01 yanılma ile farklı bulunmuştur. 0.5mg/l BAP dozu 2.0 mg/l BAP dozuna göre 0.05 yanılma ile farklılık göstermiştir. 0.5 mg/l BAP dozu ile 1.0 mg/l BAP dozu arasında ve 1.0 mg/l BAP dozu ile 2.0 mg/l BAP dozu arasında, dozların artmasına paralel olarak sürgün sayısında azalma olmasına karşın bu farklılık, istatistik olarak önemli çıkmamıştır.

Sürgün uzunluğu bakımından; 0.2 mg/l BAP dozunun 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l BAP dozlarına göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu tesbit edilmiştir. Yine 0.5 mg/l BAP dozunun, 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP dozuna kıyasla 0.01 yanılma ile farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır. 1.0 mg/l BAP dozunun, 2.0 mg/l BAP dozuna göre 0.05 yanılma ile farklı olduğu bulunmuştur.

Sürgünlerdeki nod sayısı bakımından; 0.2 mg/l BAP dozu ile 0.5 mg/l BAP dozu arasında istatistik düzeyde bir farklılık bulunamazken, 0.2 mg/l BAP dozunun, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l BAP dozlarına göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu belirlenmiştir. Yine 0.5 mg/l BAP dozu ile 1.0 mg/l BAP dozu arasında ve 0.5 mg/l BAP dozu ile 2.0 mg/l BAP dozu arasındaki farklılığın 0.01 yanılma ile anlamlı olduğu bulunmuştur. 1.0 mg/l BAP dozu ile 2.0 mg/l BAP dozu arasında 0.05 yanılma ile farklılık saptanmıştır.

10 haftalık kültür periyodundan sonra, farklı BAP dozlarında, sürgün farklılaşması ve çoğalması görülen tomurcuk eksplantları parçalanarak; sürgün sayısı, uzunluğu ve nod sayısı bakımından diğer dozlara göre daha iyi sonuç veren 0.2 mg/l BAP dozunun eklendiği WPM ortamlarına 4 - 6 haftada bir aktarılmıştır. Bu ortamda parçalanmış tomurcuk eksplantlarında sürgün çoğalması ve uzaması devam etmiştir. Bu şekilde parçalanmış bazal dokularda çok sayıda sürgün ve kök elde edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10 :Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında Sürgün Çoğalması ve Kök Oluşumu

Yapılan gözlemlerde; sürgün çoğalması gerçekleşen ve parçalanarak, 0.2 mg/l BAP'ın eklendiği WPM ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda kültürden 6 - 8 hafta sonra bazı explantlarda hem sürgün çoğalması ve hem de köklenmenin olduğu görülmüştür (Şekil 11). O1 ve O2 nolu ortetlerden alınan eksplantlarda oluşan sürgünlerde, yapraklar genel olarak küçük yüzeyler oluşturmuşlardır. Kültür değişimlerinde sürgünlerin selekte edilerek kesilmesi, büyük yaprak yüzeylerinin oluşmasını sağlamıştır (Şekil 12).



Şekil 11 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi



Şekil 12 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Seleksiyonu İle Yaprak Yüzeylerinin Artması

3.1.3. BAP + IBA Doz ve Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi

Tablo 1'de verilen O1 ve O2 no lu ortetlere ait tomurcuk eksplantları, BAP'ın 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l' lik dozlarının, IBA' nın 0.1 mg/l dozu ile kombine edilerek eklendiği MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır.

MS ortamlarına konan eksplantlarda 7 - 10. günden itibaren yapılan gözlemlerde, genç yaprak taslaklarında bir gelişme olmamıştır. Yaprakların gelişme olmaksızın kahverengileşmeye başladığı görülmüştür. WPM ortamlarında genç yaprak taslaklarında uzamalar olmuş ve yaprakların odunsu doku ile birleşim noktalarında, beyaz renkli kallus oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra yapraklarda (3 hafta sonra) kahverengileşmeler ve sararmalar belirlenmiştir. Eksplantların kültüre alınmasından 1 ay sonra MS ortamlarına konan eksplantlarda yapraklar, tamamiyle kahverengileşmiştir (Şekil 13, 14).



Şekil 13 : BAP' ın (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l), IBA (0.1 mg/l) İle Kombine Edilerek Eklendiği MS Ortamlarında, Eksplantların Kültüre Alınmadından 1 Ay Sonraki Gelişme Durumu



Şekil 14 : BAP'ın (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l), IBA (0.1 mg/l) İle Kombine Edilerek Ekendiği WPM Ortamlarında, Ekspantların Kültüre Alınmasından 1 Ay Sonraki Gelişme Durumu

Eksplantlar aynı içerikli taze ortamlara aktarılarak 10. haftaya kadar gelişmeleri izlenmiştir. Her iki ortamda da bütün kombinasyonlarda sürgün oluşumu ve gelişimine yönelik bir farklılaşma görülmemiştir.

3.1.4. Kinetin Dozlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi

Birkaç genç yaprak taslağı taşıyan tomurcuk eksplantları, kinetinin 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l eklendiği MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır. Eksplantlardaki Gelişme durumu 10. haftaya kadar, explantlar 4 haftada bir taze ortamlara aktarılarak izlenmiştir.

Eksplantların kültüre alınmasını takibeden 7 - 10 gün içerisinde bir gelişme görülmemiştir. MS ortamında eksplantlarda yaprak taslaklarında, kahverengileşmeler görülmüş ve bir gelişme olmamıştır. WPM ortamlarında ise genç yaprak taslaklarında, yeşillenme ve uzama gözlenmiştir. Kültürden 1 ay sonra yapılan gözlemlerde, WPM ortamlarında, yaprakların odunsu doku ile birleşim yerlerinde beyaz renkte kallus oluşumu ve yaprakların uzamış olduğu görülmüştür. MS ortamlarında ise yapraklarda kahverengileşme olmuştur (Şekil 15, 16).

Tomurcuklar aynı nitelikli taze ortamlara aktarılarak 10. haftaya kadar izlenmiş ancak, sürgün oluşumu ve gelişimine yönelik bir gelişme görülmemiştir.

3.1.5. Kinetin + IBA Doz ve Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Gelişimine Etkisi

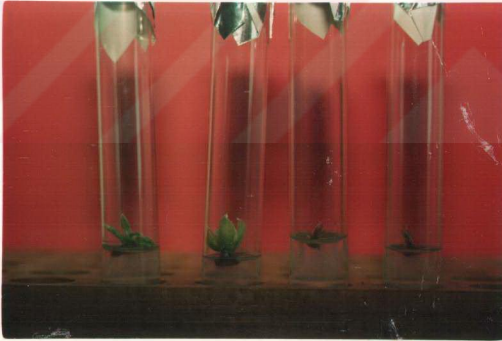
Kinetinin 0, 0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l'lik dozları 0.1 mg/l IBA dozu ile ombine edilerek eklendiği MS ve WPM ortalarında, kültür başlangıcından itibaren gözlemler yapılmıştır. MS ortamlarındaki eksplantlarda ilk haftadan itibaren yapraklarda sararmalar ve kahverengileşmelerin olduğu görülmüştür. WPM ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda, genç yaprak taslaklarında bir miktar uzama olmasına karşın, bunlarda da yapraklarda sararma ve kahverengileşmelerin olduğu gözlenmiştir. Kültürden 4 hafta sonra, MS ve WPM ortamlarındaki tüm kinetin + IBA kombinasyonlarında, sürgün oluşumuna yönelik bir gelişme olmamıştır (Şekil 17). MS ortamındaki kombinasyonlarda, tomurcuk yaprakları kahverengileşmiş, kallus oluşumu görülmemiştir. Bu nedenle bu eksplantlar taze ortamlara aktarılmamışlardır. WPM ortamındakiler ise, aynı içerikli taze ortamlara aktarılarak gelişmeler izlenmiş ancak, sürgün oluşumuyla ilgili bir gelişme görülmemiştir.



Şekil 15 : MS + 0.5 mg/l Kinetin Ortamında Kültürden 1 Ay sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu



Şekil 16 : WPM + 0.5 mg/l Kinetin Ortamında Kültürden 1 Ay Sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu



Şekil 17 : WPM ve MS'nin 0.2 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l IBA Eklendiği Ortamlarında Kültürden 1 Ay Sonra Tomurcuklardaki Gelişme Durumu (Soldaki İki Tüp WPM, Diğer İki Tüp MS ortamındaki Gelişmeyi Göstermektedir.)

3.1.6. Farklı Ortetlere Ait Eksplantların 0.2 ve 0.5 mg/l BAP Dozlarındaki Gelişme Durumları

Tablo 1'de kod numaraları verilen değişik yaşlı 6 farklı ortetin dormansi dönemi içerisinde alınmış tomurcukları; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı bakımından daha iyi sonuç veren 0.2 ve 0.5 mg/l BAP dozlarının eklendiği WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır.

Bütün ortetlerin tomurcuk eksplantlarında dormansi, eksplantlar kültüre alındıktan sonra 7 - 10. günden itibaren kırılmaya başlamış, explantların bazal kısımlarında şişmeler, genç yaprak taslaklarının odunsu doku ile birleşim noktalarında beyaz renkli kallus oluşumları görülmüştür. Genç yaprak taslaklarında büyüme ve gelişme gözlenmiştir.

O3 nolu ortetin eksplantlarında 28. günden itibaren sürgün farklılaşmasının başladığı tespit edilmiştir. Ancak bu farklılaşma zayıf düzeyde görülmüştür. Eksplantlarda görülen kallus oluşumu 0.5 mg/l BAP' da 0.2 mg/l BAP' a oranla daha fazla miktarda olmuştur.

O4 nolu ortetin eksplantlarında, diğer ortetlere kıyasla farklılaşma daha kısa sürede; 17 - 18. günlerde görülmüştür. Bu ortetin tomurcuklarında oluşan az oranda kallusun 0.5 mg/l BAP ortamında, 0.2 mg/l BAP' a kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir.

O5 nolu ortetin tomurcuklarında da sürgün farklılaşması O3 nolu ortetin eksplantlarında olduğu gibi, daha kısa sürede; 16 - 17. günlerden itibaren görülmüştür. Bu ortetin eksplantlarında da, bazal kısımlarda ve genç yaprak taslaklarının odunsu doku ile birleşim noktalarında görülen beyaz renkli kallus oluşumu, 0.5 mg/l BAP'da daha fazla oranda gözlenmiştir.

O6 nolu ortetin tomurcuk eksplantlarında sürgün farklılaşmasının 22. günden itibaren başladığı gözlenmiştir. Diğer ortetlerin eksplantlarında olduğu gibi, bu ortetin eksplantlarında da kallus oluşum oranı, 0.5 mg/l BAP' da 0.2 mg BAP' a göre daha fazla oranda görülmüştür.

O7 nolu ortetin eksplantlarında, gerek 0.2 ve gerekse 0.5 mg/l BAP ortamında sürgün farklılaşması çok zayıf düzeyde olmuştur. 27 - 28. günden itibaren bazı eksplantlarda çok zayıf sürgün oluşumları görülmüştür. Bunlar, aynı içerikli taze ortamlara taşınıp 10. haftaya kadar gözlenmiş ancak, sürgün oluşumu sınırlı düzeyde kalmış ve büyüme gerçekleşmemiştir. O nedenle O7 nolu ortet değerlendirmelere dahil edilmemiştir.

Tablo 1' de O8 kodu ile verilen genç ortetlerden alınan tomurcuklarla kurulan denemelerde, sürgün farklılaşması 17 - 18. günden itibaren

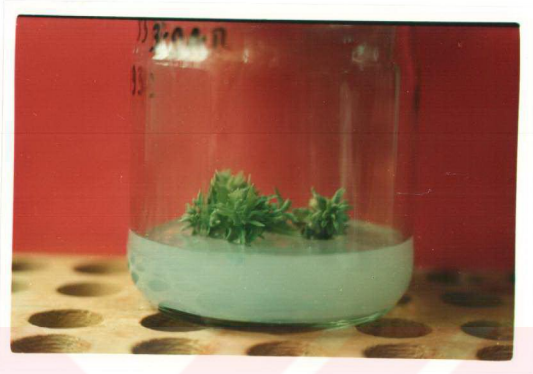
görölmeye başlamıştır. Eksplantlarda önce genç yaprak taslakları uzamış ve daha sonra sürgün oluşumu gerçekleşmiştir.

Tomucukların kültüre alınmasından 10 hafta sonra 0.2 mg/l ve 0.5 mg/l BAP ortamında bazı ortetlerdeki gelişim durumları Şekil 18, 19, 20, 21, 22 ve 23'de gösterilmiştir.

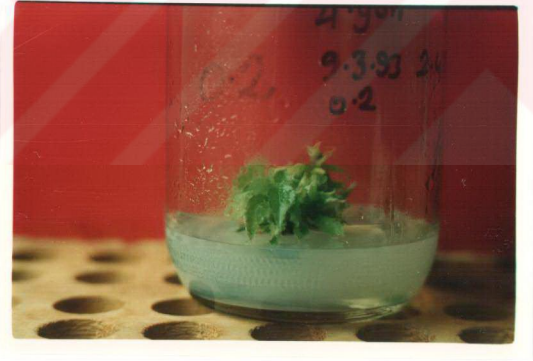


Şekil 18 :WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O4 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması

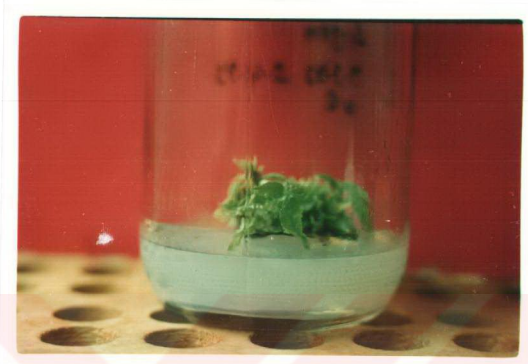
Bütün ortetlerde, 0.2 mg/l ve 0.5 mg/l BAP ortamında kültüre alınan eksplantlar her 4 - 5 haftada bir aynı nitelikli taze ortamlara aktarılmışlardır. Kültürden 10 hafta sonra eksplantlar üzerinde oluşan ortalama sürgün sayıları, maksimum ve minimum sürgün uzunlukları, ortalama sürgün uzunlukları ve bu sürgünlerdeki ortalama nod sayıları belirlenmiştir. Buna göre elde edilen değerler, 0.2 mg/l BAP ortamı için Tablo 16, 0.5 mg/l BAP ortamı için Tablo 18'de verilmiş, 0.2 mg/l BAP ortamındaki değerler Şekil 24, 25, 26 ve 27'de, 0.5 mg/l BAP ortamındaki değerler ise Şekil 28, 29, 30 ve 31'de gösterilmiştir.



Şekil 19 :WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O4 Nolu Ortete Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması



Şekil 20 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O5 Nolu Ortete Ait Eksplantta Sürgün Çoğalması



Şekil 21 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O5 Nolu Ortete Alt Eksplantlarda Sürgün Çoğalması



Şekil 22 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantta Sürgün Çoğalması



Şekil 23 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantlarda Sürgün Çoğalması

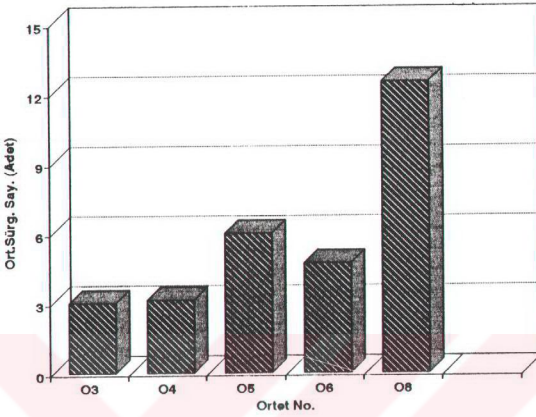
Tablo 16 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Gelişme Sonuçları (Kültür Başlangıcından 10 Hafta Sonra)

Ortet No	BAP Dozu (mg/l)	Bir Eksp. İçin Ort. Sür. Say.	Maks. Sür. Uz. (mm)	Min. Sür. Uz. (mm)	Ort. Sür. Uz. (mm)	Ort. Nod Say. (Adet)
O3	0.2	3.0	6.0	4.0	5.50	1.22
O4	0.2	3.12	20.0	7.0	12.22	2.90
O5	0.2	6.0	25.0	3.0	12.00	2.65
O6	0.2	4.70	20.0	4.0	9.56	2.39
O8	0.2	12.50	32.0	6.0	12.91	3.55

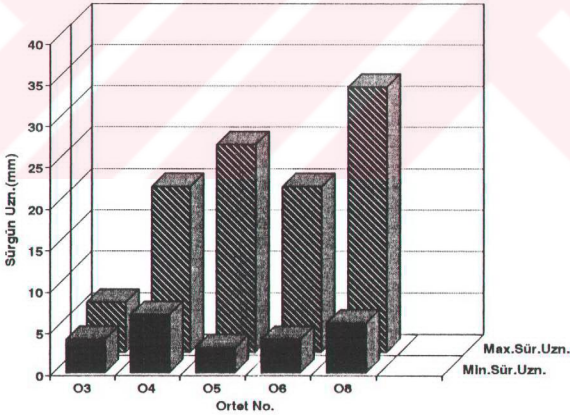
Tablo 16 ve Şekil 24 incelendiğinde görüleceği gibi 0.2 mg/l BAP eklenen ortamlarda, en yüksek ortalama sürgün sayısı, genç ortetlerden elde edilen tomurcuklarda oluşmuştur. Bunu sırasıyla O5, O6, O4 ve O3 nolu ortetler izlemiştir

Maksimum ve minimum sürgün uzunluğu bakımından, ortetlere göre farklılıklar belirlenmiş, en uzun sürgün uzunluğu O8 nolu ortetin eksplantlarında ölçülmüştür. Bunu sırasıyla O5 nolu ortet izlemiş, O4 ve O6 nolu ortetler aynı değerde bulunmuş ve en son olarak da O3 nolu ortet izlemiştir. Minimum sürgün uzunluğu bakımından; en uzun sürgün O4 nolu

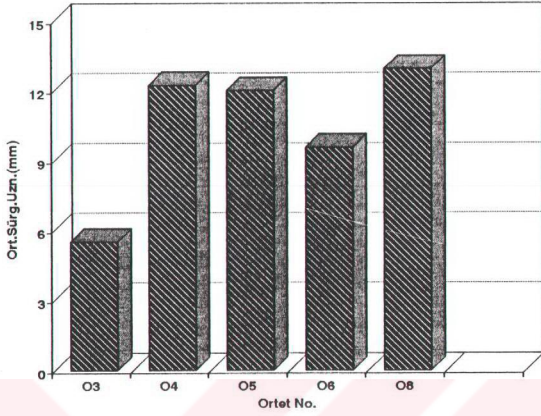
ortede oluşmuş, bunu sırasıyla O8, O3 O6 ve O5 ortetleri izlemiştir (Tablo 16, Şekil 25).



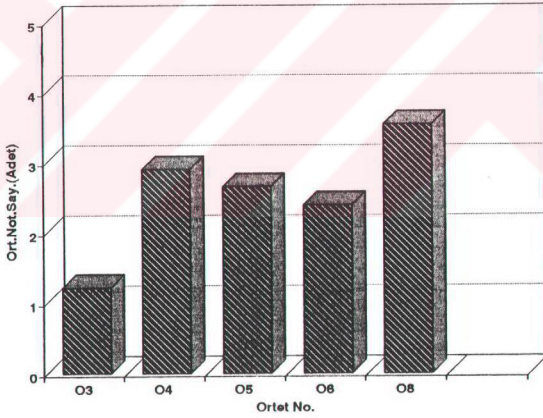
Şekil 24 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Sayısı



Şekil 25 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunlukları



Şekil 26 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Uzunlukları



Şekil 27 : WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Nod Sayısı Farklılıkları

Ortalama sürgün uzunluğunda en iyi sonuç, O8 eksplantlarında bulunmuş, bunu sırasıyla O4, O5, O6 ve O3 nolu ortetler izlemiştir (Tablo 16, Şekil 26).

Eksplantların kültüre alınmasından 10 hafta sonra, belirlenen bir diğer özellik olan ortalama nod sayılarında da ortetlere göre farklılıklar görülmüştür. (Tablo 16, Şekil 27). O8 kodu verilen ve genç ortetlere ait eksplantlarda oluşan sürgünlerdeki nod sayıları, en yüksek bulunmuş, bunu sırasıyla O4, O5, O6 ve O3 nolu ortetler izlemiştir.

Ortetler arasında sürgün sayısı, sürgün boyu ve nod sayıları bakımından oluşan farklılıkların istatistiksel olarak kontrolünü yapmak için varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17: WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Değişik Ortetlerden Kültüre Alınan Eksplantlarda, Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

İncelenen Özellik	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	S. D.	Kareler Ort.	F - Oranı	Olasılık	Duncan Testi Sonuçları				
							O4	O5	O6	O8	
Sürgün Sayısı	Gruplar ar.	13.386	4	3.346	25.455	.0000	O3	0	2	0	2
	Gruplar içi	3.81	29	.131			O4		1	0	2
	Toplam	17.199	33				O5			0	2
							O6				2
Sürgün Uzunl.	Gruplar ar.	630.107	4	157.526	6.564	.0001	O3	2	2	1	2
	Gruplar içi	2879.684	120	23.997			O4		0	0	0
	Toplam	3509.792	124				O5			0	0
							O6				0
Nod Sayısı	Gruplar ar.	3.475	4	.868	14.079	.0000	O3	2	2	2	2
	Gruplar içi	7.899	128	.061			O4		0	0	2
	Toplam	11.375	132				O5			0	1
							O6				2

* : Duncan Testi Sonuçları

0 = İstatistiksel olarak önemli farklılık belirlenmemiştir.

1 = Fark 0.05 yanılmayla önemlidir.

2 = Fark 0.01 yanılmayla önemlidir.

Tablo17 incelendiğinde görüleceği gibi, 0.2 mg/l BAP ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen bulguların varyans analizi sonuçlarında; sürgün sayısı sürgün uzunluğu ve nod sayısı gibi incelenen

bütün özellikler bakımından, ortetler arasında kuvvetli düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Ortetler arasındaki farklılıkları ortaya koymayı amaçlayan Duncan testi sonuçları şu şekilde sıralanabilir :

Sürgün sayısı bakımından, O8 kodlu genç ortetlerin tomucuklarında oluşan sürgün sayısı, O3 nolu ortetin tomucuklarında oluşan sürgünlerin sayısına göre 0.01 yanılma ile farklı bulunmuştur. Yine aynı şekilde O8 nolu fidanlara ait tomucuklarda oluşan sürgün sayısı, O4, O5 ve O6 nolu ortetlerin sürgün sayısına göre 0.01 yanılma ile farklıdır. O5 nolu ortet ile O3 nolu ortet arasında da 0.01 yanılma ile farklılık mevcuttur. O5 nolu ortet ile O4 nolu ortetin sürgün sayıları arasında ise 0.05 yanılma ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Diğer ortetler arasında istatistiksel anlamda bir farklılık belirlenememiştir.

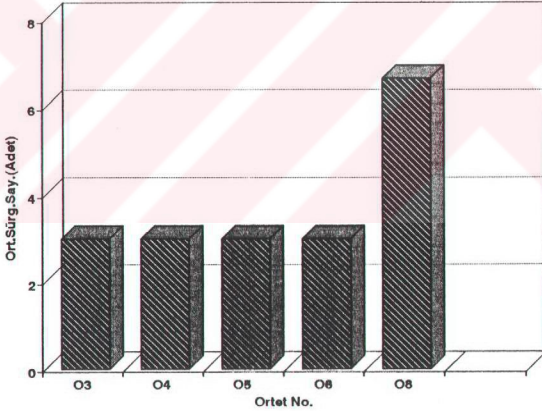
Sürgün uzunluğu bakımından ortetler arasında oluşan farklılıklar incelendiğinde; O8 kodlu ortetlerin tomucuklarından oluşan sürgün boyları, O3 nolu ortetin sürgün boylarından 0.01 yanılma ile, O4 nolu ortetin tomucuklarından oluşan sürgünlerin boylarında ise O3 nolu ortetin tomucuklarından oluşan sürgün boylarına göre 0.01 yanılma ile, O5 nolu ortetin tomucuklarından oluşan sürgünlerin boylarında ise O3 nolu ortetin tomucuklarından oluşan sürgünlerdeki boylara göre 0.01 yanılma ile daha fazla olduğu belirlenebilmiştir. O6 nolu ortetle O3 nolu ortetin tomucuklarından elde edilen sürgünler arasında da 0.05 yanılma ile anlamlı farklılık bulunmuştur. Diğer ortetlerin tomucuklarından elde edilen sürgün boyları arasında ise anlamlı bir farklılık yoktur.

İn vitro'da farklılaşmış sürgünlerdeki nod sayısı değerlerine bakıldığında; ortetler arasında anlamlı farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Buna göre ortetler arasında; O4 nolu ortetin sürgünlerdeki nod sayısının O3 nolu ortetin nod sayısına göre 0.01 yanılma ile, O5 nolu ortetin sürgünlerdeki nod sayılarının O3 nolu ortetin nod sayısına göre 0.01 yanılma ile, O6 nolu ortetin O3 nolu ortetin nod sayısına göre 0.01 yanılma ile ve O8 nolu ortetlerin O3 nolu ortetin nod sayısına göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu belirlenmiştir. O8 ile O5 nolu ortetler arasında da 0.01 yanılma ile farklılık mevcuttur. Diğer ortetler arasında ise, farklılaşmış sürgünlerdeki nod sayısı bakımından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Tablo 18 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında Farklı Ortetlere Ait Eksplantlardaki Gelişme Sonuçları

Ortet No	BAP Dozu (mg/l)	Bir Eksp. İçin Ort. Sür. Say.	Maks. Sür. Uz. (mm)	Min Sür. Uz. (mm)	Ort. Sür. Uz. (mm)	Or. Nod. Say. (Adet)
O3	0.5	3.0	11.0	3.0	5.41	1.88
O4	0.5	3.0	15.0	4.0	9.0	2.05
O5	0.5	3.0	15.0	5.0	9.35	2.20
O6	0.5	3.0	6.0	4.0	4.78	1.50
O8	0.5	6.66	22.0	8.0	12.50	2.96

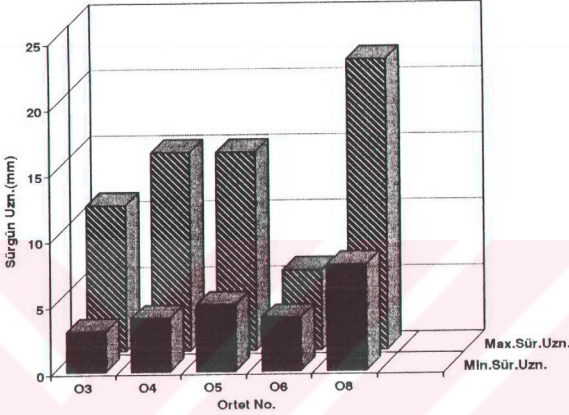
Tablo 18 ve Şekil 28 incelendiğinde görüleceği gibi 0.5 mg/l BAP eklenen ortamlarda, en yüksek ortalama sürgün sayısı genç ortetlerden elde edilen (O8 nolu) tomurcuklarda oluşmuştur. Bunu diğer ortetlerin tomurcuk eksplantları izlemiştir. Diğer ortetlerin (O3, O4, O5 ve O6) sürgün sayıları arasında farklılık olmamıştır.



Şekil 28 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Sayısı

In vitro'da elde edilen maksimum ve minimum sürgün uzunluğu bakımından, ortetlere göre farklılıklar belirlenmiş, en uzun sürgün uzunluğu, 0.2 mg/l BAP ortamında olduğu gibi, O8 nolu ortetlerde ölçülmüştür. Bunu

sırasıyla, O4 - O5 nolu ortetler aynı değerle ve O3 ve O6 nolu ortetler izlemiştir. Minimum sürgün uzunluğu bakımından, en uzun sürgün O8 nolu ortetlerin eksplantlarından oluşmuş, bunu sırasıyla, O5 nolu ortet, O4 - O6 nolu ortetler aynı değerle ve O3 nolu ortet izlemiştir (Tablo 18, Şekil 29).

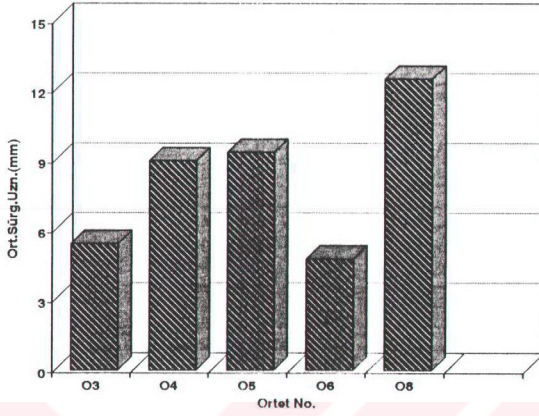


Şekil 29 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Maksimum ve Minimum Sürgün Uzunluğu

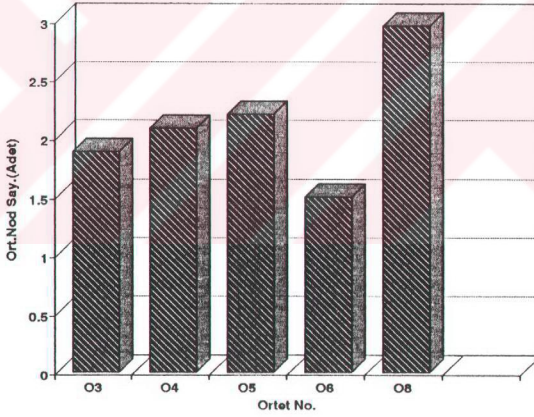
Ortalama sürgün uzunluğunda en iyi sonuç, 0.2 mg/l BAP ortamında olduğu gibi 0.5 mg/l BAP ortamında da O8 nolu ortetde bulunmuş, bunu sırasıyla O5, O4, O3 ve O6 kod nolu ortetler izlemiştir (Tablo 18, Şekil 30)

Eksplantların kültüre alınmasından 10 hafta sonra belirlenen bir diğer özellik olan ortalama nod sayılarında da, ortetlere göre farklılıklar görülmüştür (Tablo 18, Şekil 31). O8 kodu verilen ve genç ortetlere ait eksplantlardan oluşan sürgünlerdeki nod sayıları en yüksek bulunmuş, bunu sırasıyla O5, O4, O3 ve O6 nolu ortetler izlemiştir.

Ortetler arasında sürgün sayısı, sürgün boyu ve nod sayıları bakımından, oluşan farklılıkların istatistiksel olarak kontrolünü yapmak için varyans analizi ve Durcan testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 19'da verilmiştir.



Şekil 30 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Ortalama Sürgün Uzunluğu



Şekil 31 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamındaki Farklı Ortetlerde, Eksplantlardaki Ortalama Nod Sayısı

Tablo 19 : WPM + 0.5 mg/l BAP Ortamında Değişik Ortetlerden Kültüre Alınan Eksplantlarda, Kültürden 10 Hafta Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

İncelenen Özellik	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F - Oranı	Olasılık	Duncan Testi Sonuçları*				
							O4	O5	O6	O8	
Sürgün Sayısı	Gruplar ar.	.716	4	.716	8.511	.0003	O3	0	0	0	2
	Gruplar içi	.084	21				O4	0	0	2	
	Toplam	4.632	25				O5		0	2	
							O6			2	
Sürgün Uzunl.	Gruplar ar.	609.988	4	152.499	18.270	.0000	O3	2	2	0	2
	Gruplar içi	600.988	72	8.347			O4	0	2	2	
	Toplam	1210.987	76				O5		2	2	
							O6			2	
Nod Sayısı	Gruplar ar.	2.108	4	.527	9.822	.0000	O3	0	0	0	2
	Gruplar içi	4.347	81	.053			O4	0	1	2	
	Toplam	6.456	85				O5		1	2	
							O6			2	

*. Duncan Testi Sonuçları

0 = İstatistiksel anlamda önemli farklılık belirlenmemiştir.

1 = Fark 0.05 yanılmayla önemlidir.

2 = Fark 0.01 yanılmayla önemlidir.

Tablo 19 incelendiğinde görüleceği gibi, 0.5 mg/l BAP ortamında kültüre alınan eksplantlarda elde edilen değerlerin, varyans analizi sonuçlarına göre; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı gibi, incelenen bütün özellikler bakımından, gruplar arasında kuvvetli düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Ortetler arasındaki farklılıkları ortaya koymayı amaçlayan Duncan testi sonuçları şu şekilde belirtilmiştir:

Tomurcuk eksplantları üzerinde oluşan sürgün sayısı bakımından, O8 nolu genç ortetlerdeki sürgün sayısının; O3 nolu ortetin tomurcuklarından oluşan sürgün sayısına göre, O4 nolu ortetin tomurcuklarından oluşan sürgün sayısına göre, O5 nolu ortetin tomurcuklarından oluşan sürgün sayısına göre ve O6 nolu ortetin tomurcuklarından oluşan sürgün sayısına göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu belirlenmiştir. Diğer tüm ortetler arasında sürgün sayısı bakımından, istatistiksel düzeyde anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Sürgün uzunluğu bakımından ortetler arasında oluşan farklılıklar incelendiğinde; O4 nolu ortet ile O3 nolu ortet arasında, O5 nolu ortet ile O3

nolu ortet arasında, O6 nolu ortet ile O4 nolu ortet arasında, O6 nolu ortet ile O5 nolu ortet arasında, O8 nolu ortetler ile O5 nolu ortet arasında ve O8 nolu ortetler ile O6 nolu ortet arasında 0.01 yanılma olasılığı ile anlamlı bir farklılığın olduğu anlaşılmaktadır. Bu farklılık, O6 ve O3 nolu ortetler ile O5 ve O4 nolu ortetler arasında ortaya çıkmamıştır.

Sürgünlerdeki nod sayıları bakımından da bazı ortetler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya çıkmıştır. O8 nolu ortetlerdeki eksplantlarda oluşan sürgünlerin nod sayıları; O3 nolu ortete göre, O4 nolu ortete göre, O5 nolu ortete göre ve O6 nolu ortete göre 0.01 yanılma olasılığı ile farklı bulunmuştur. O6 nolu ortet ile O4 nolu ortet arasında ve O6 nolu ortet ile O4 nolu ortet arasında ve O6 nolu ortet ile O5 nolu ortet arasında 0.05 yanılma ile anlamlı farklılıklar belirlenebilmiştir. Diğer ortetler arasında ise, her iki yanılma düzeyinde de anlamlı farklılıklar bulunmamıştır.

Tablo 20 : Kültürden 10 Hafta Sonra 0.2mg/l ve 0.5 mg/l BAP Dozları Arasındaki Değişimlerin İstatistiksel Denetimlerine Ait Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

İncelenen Özellik	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F - Oranı	Olasılık	Duncan Testi BAP (mg/l)	Sonuç.
Sürgün Sayısı	İşlemler	2.113	1	2.113	18.938	.0001	0.2	2.404**
	Ortetler	12.972	4	3.243	29.060	.0000	0.5	2.021
	Etkileşim	1.857	4	.464	4.161	0.055		
	Hata	5.580	50	.111				
	Toplam	24.331	59					
Sürgün Uzunl.	İşlemler	203.476	1	203.476	11.224	.0010	0.2	10.441**
	Ortetler	1160.173	4	290.043	15.999	.0000	0.5	8.211
	Etkileşim	139.976	4	34.994	1.930	.1070		
	Hata	3480.672	192	18.128				
	Toplam	4920.935	201					
Nod Sayısı	İşlemler	.512	1	.512	8.802	.0034	0.2	1.707**
	Ortetler	4.972	4	1.243	21.333	.0000	0.5	1.595
	Etkileşim	.863	4	.215	3.704	.0062		
	Hata	12.178	209					
	Toplam	18.484	218					

** : Fark 0.01 yanılmayla önemlidir.

0.2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l BAP ortamında kültüre alınan farklı ortetlere ait eksplantlarda kültürden 10 hafta sonra, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı gibi tespit edilen özellikler bakımından, BAP dozları arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 20' de verilmiştir.

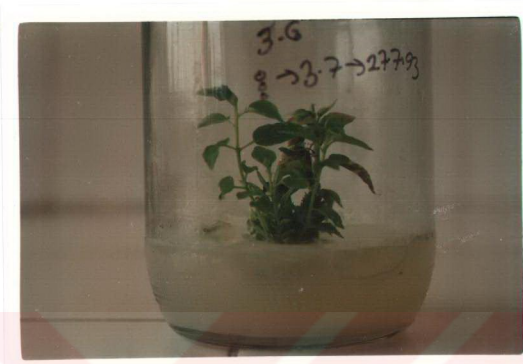
Tablo 20 incelendiğinde, 0.2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l BAP' lı ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan elde edilen değerlerin varyans analiz sonuçlarına göre; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı gibi incelenen bütün özellikler bakımından, BAP dozları ve ortetler arasında kuvvetli düzeyde anlamlı farklılıklar bulunduğu görülmektedir.

Yapılan Duncan testi sonucunda; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı bakımından 0.2 mg/l BAP dozunun, 0.5 mg/l BAP dozuna göre 0.01 yanılma ile daha etkili olduğu belirlenebilmiştir.

WPM + 0.2 mg/l BAP ve WPM + 0.5 mg/l BAP ortamında sürgün farklılaşmasının görüldüğü çeşitli ortetlere ait tomurcuk eksplantları parçalanarak, sürgün çoğalmasının devamını sağlamak için, daha etkili olduğu belirlenen WPM + 0.2 mg/l BAP ortamına 4 - 6 haftada bir aktarılarak, kültüre alınmaya devam edilmiştir. Bu ortamda, parçalanmış tomurcuk eksplantlarında sürgün çoğalması ve uzaması devam etmiştir. Parçalanmış bazal dokularda sürgün çoğalması ve uzaması ile çok sayıda sürgün elde edilmiştir (Şekil 32, 33 ve 34). Bu sürgünler bazal dokulardan ayrılarak, köklendirme denemelerinde kullanılmışlardır. Sürgünlerin kesildiği bazal dokular, yeni sürgünlerin oluşumu ve çoğalması için, WPM + 0.2 mg/l BAP ortamında kültüre alınmaya devam edilmiştir.

Yapılan gözlemlerde; sürgün çoğalması gerçekleşen ve parçalanarak, 0.2 mg/l BAP' in eklendiği WPM ortamında kültüre alınan eksplantlarda, kültürden 6 hafta sonra, bazı eksplantlarda hem sürgün çoğalması ve hem de köklenmenin olduğu görülmüştür (Şekil 35 ve 36).

Köklenme görülen eksplantlarda sürgünler, kökle birlikte bazal dokudan ayrılarak toprağa şaşırtılmışlardır. Bazal dokular sürgün oluşumu ve çoğalmasını sağlamak için tekrar kültüre alınmaya devam edilmiştir.



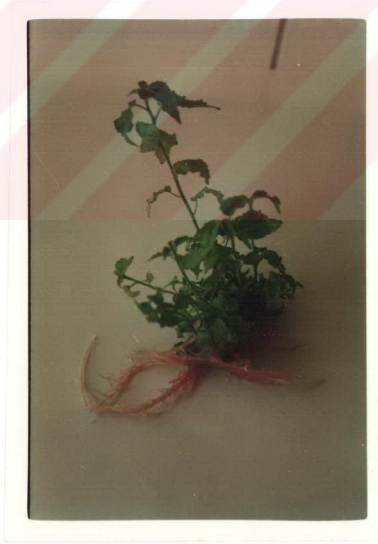
Şekil 32 : O4 Nolu Ortetin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması



Şekil 33 : O5 nolu Ortetin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması



Şekil 34 : O8 Nolu Ortetlerin Parçalanmış Tomurcuk Eksplantlarında, WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün Çoğalması



Şekil 35 : O8 Nolu Ortetlere Ait Eksplantta WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi



Şekil 36 : O5 Nolu Ortetde WPM + 0.2 mg/l BAP Ortamında Sürgün ve Kök Farklılaşmasının Birlikte Görülmesi

3.1.7. IBA + NAA Doz ve Kombinasyonlarının Mikroçeliklerin Köklenmesi Üzerine Etkileri

IBA ve NAA'nın mikroçeliklerin köklenmesi üzerine etkisini belirlemek için, değişik ortetlerden (O1, O2, O3, O4, O5, O6 ve O8) elde edilen mikroçelikler, 1/2 ve 1/4 WPM ortamlarına; IBA (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l)'nin doz ve kombinasyonları eklenerek kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan mikroçeliklerdeki köklenme durumu 4 hafta süreyle izlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 21'de verilmiştir.

1/2 WPM ortamlarında köklenmeye alınan mikroçeliklerde, kültürden 10 gün sonra yapılan gözlemlerde, sürgünlerin bazal kısımlarında şişmeler ve beyaz renkli kallus oluşumları görülmüş, kültürden 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde köklenmenin hiç bir mikroçelikde gerçekleşmediği gözlenmiştir (Şekil 37).

1/4 WPM ortamlarında kültüre alınan mikroçeliklerde, kültür başlangıcını takiben 10. günden itibaren bazal kısımlarda şişme, beyaz renkli kallus oluşumu ve kallus oluşan bölgelerde yıldız şeklinde kök farklılaşmaları gözlenmiştir. Mikroçeliklerin köklendirmeye alınmasından 1 ay sonra (Şekil 38), mikroçelikler üzerinde oluşan bu köklerin sayısının 2 - 5

arasında, kök uzunluğunun da 3 - 5 mm arasında değiştiği belirlenmiştir. Buna göre IBA ve NAA doz ve kombinasyonlarında köklenmenin görüldüğü mikroçelik sayısı ve oranı Tablo 21' de verilmiş ve Şekil 39'da gösterilmiştir.

Tablo 21 : Sürgünlerin Köklendirilmesinde Denenen Ortamlar ve Köklenme Durumları

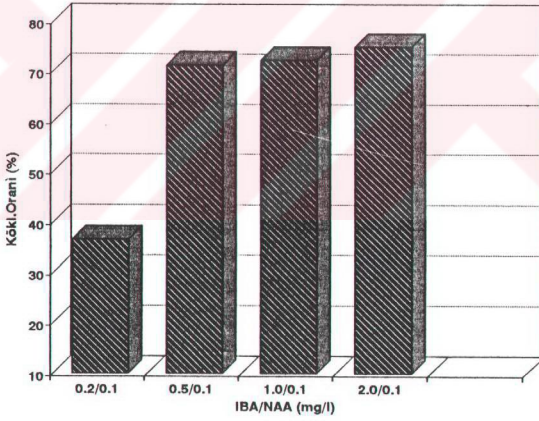
Ortam Adı	Hormon IBA	Dozu NAA (mg/l)	Kültüre Al. (Adet)	Mikroçelik Say. (Adet)	Kökl. Sürgün Say. (Adet)	Köklenme Oranı (%)
1/2 WPM	0.2	0.1	20	20	--	--
1/2 WPM	0.5	0.1	20	20	--	--
1/2 WPM	1.0	0.1	22	22	--	--
1/2 WPM	2.0	0.1	22	22	--	--
1/4 WPM	0.2	0.1	22	22	8	36.66
1/4 WPM	0.5	0.1	21	21	15	71.42
1/4 WPM	1.0	0.1	24	24	14	72.33
1/4 WPM	2.0	0.1	20	20	15	75.00



Şekil 37 : 1/2 WPM + 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA Ortamında Mikroçeliklerin Kültürden 1 Ay Sonraki Köklenme Durumu



Şekil 38 : 1/4 WPM + 2.0 mg/l IBA + 0.1 mg/l NAA Ortamında Mikroçeliklerin Kültürden 1 Ay Sonraki Köklenme Durumu



Şekil 39 : Farklı IBA + NAA Kombinasyonlarının Mikroçeliklerin Köklenme Oranına Etkileri

Tablo 21 ve Şekil 39 incelendiğinde görüleceği gibi, mikroçeliklerin köklenmesi WPM ortamının ve IBA + NAA kombinasyonlarının dozuna göre değişiklik göstermiştir. IBA ve NAA'nın aynı doz ve kombinasyonları kullanılmasına karşın, 1/2 WPM ortamlarında kök farklılaşması görülmezken, daha zayıf olan 1/4 WPM ortamı kullanıldığında, köklenme gerçekleşmiş ve köklenme oranı IBA + NAA kombinasyonlarına göre farklılık göstermiştir. NAA, 0.1 mg/l'da sabit eklenerek, IBA dozları 0.2 mg/l'dan 2.0 mg/l'a artırıldığında, köklenme oranında artışlar olmuştur. Köklenme oranı, % 36.66 ile en düşük oranda 0.2 mg/l IBA + 0.1 mg/l NAA ortamında görülmüş, diğer kombinasyonlarda ise köklenme oranları (% 71.42, % 72.33 ve % 75.00) genel olarak birbirlerine yakın seviyelerde olmuştur.

Köklenmenin görüldüğü sürgünler, kültüre alındıktan 1 ay sonra köklenme ortamına alınıp, agar artıkları temizlenerek, toprak karışımına şaşırtılmışlardır.

3.1.8. Mikroçeliklerin Direk Olarak Topraklı Ortamda Köklendirilmesi

İn vitro' da elde edilen mikroçeliklerin in vitro dışında köklenmesini sağlamak için, 4 : 1 : 1 oranında yaprak çürüğü : kum : perlit' den oluşan bir toprak karışımı kullanılmıştır. Bu topraklı karışım 30 x 30 x 10 cm ebadında hazırlanmış ahşap kasalara yerleştirilmiştir.

Sürgünler, toprak karışımına alınmadan önce, aşağıda belirtilen işlemlere tabi tutulmuştur :

1. % 0.1'lik IBA solüsyonunda 2 dakika bekletildikten sonra şaşırtılmışlardır.
2. % 0.3'lük IBA solüsyonunda 2 dakika bekletildikten sonra şaşırtılmışlardır.
3. Sürgünler hiç bir işleme tabi tutulmaksızın şaşırtılmışlardır.

Kasalar içindeki toprak karışımına şaşırtılan (Şekil 40) bu mikroçeliklerin üzerleri kasalarla aynı boyutlu şeffaf kapaklarla kapatılmıştır.

Mikroçeliklerin üzerinde yapılan gözlemlerde; yukarıda belirtilen her üç işlemde de sürgünlerde 8. günden itibaren köklenmelerin başladığı (Şekil 41) ve mikroçeliklerin toprağa şaşırtılmasından 15 gün sonra tamamen köklenmiş olduğu (Şekil 42, 43), bir başka ifadeyle % 100 köklenme ve yaşama başarısına ulaşıldığı görülmüştür.



Şekil 40 : Kasalara Şaşırtılmış Mikroçeliklerin Şaşırtmadan Hemen Sonraki Görünüşleri



Şekil 41 : Mikroçeliklerin Şaşırtılmasından 8 Gün Sonra Köklenme Durumu



Şekil 42 : Mikroçelıkların Topraklı Ortama Şaşırtılmasından 15 Gün Sonra Köklenme Durumu



Şekil 43 : Kasalara Şaşırtılmış Mikroçelıkların 15 Gün Sonra Yaşama ve Gelişme Durumu

3.1.9. Köklendirilen Mikroçeliklerin Sera Koşullarına Uyum Çalışması

Kasa içerisinde köklenmiş bitkicikler, sürgünlerin şaşırtılmasından 15 gün sonra sera koşullarına alınmışlardır. Sera koşullarında da kasalar içerisinde 15 gün süreyle bekletilen köklenmiş mikroçelikler 2 : 1 oranında toprak : perlit karışımı harçla dolu tepsi saksılara (Şekil 44) ya da aynı karışımı içeren polietilen tüplere şaşırtılmışlardır (Şekil 45). Bundan başka seraya alınan kasa içerisindeki köklenmiş mikroçelikler, bu kasalarda 1 ay bekletildikten sonra (Şekil 46), tüplere şaşırtılmışlardır. Kasalar içerisindeki köklenmiş mikroçeliklerin seraya alınmasından 2 ay sonra, tüplü fidanlar sera dışına nakledilmişlerdir. Bu şekilde farklı ortetlere ait çok sayıda fidan elde edilmiştir. Sera dışında bir kış dönemi geçiren tüplü fidanlar vejetasyon döneminin başlaması ile birlikte büyüme faaliyetine başlamışlardır (Şekil 47).



Şekil 44 :Kasalarda Köklenmesi Gerçekleşmiş Olan Fideciklerin Mikroçelik Olarak Tepsi Saksılara Şaşırtılmasından 1.5 Ay Sonraki Görünüşü



Şekil 45 : Tüplere Şaşırtılmış Fideciklerin Köklendirme Aşamasından 1.5 Ay Sonraki Gelişme Durumu

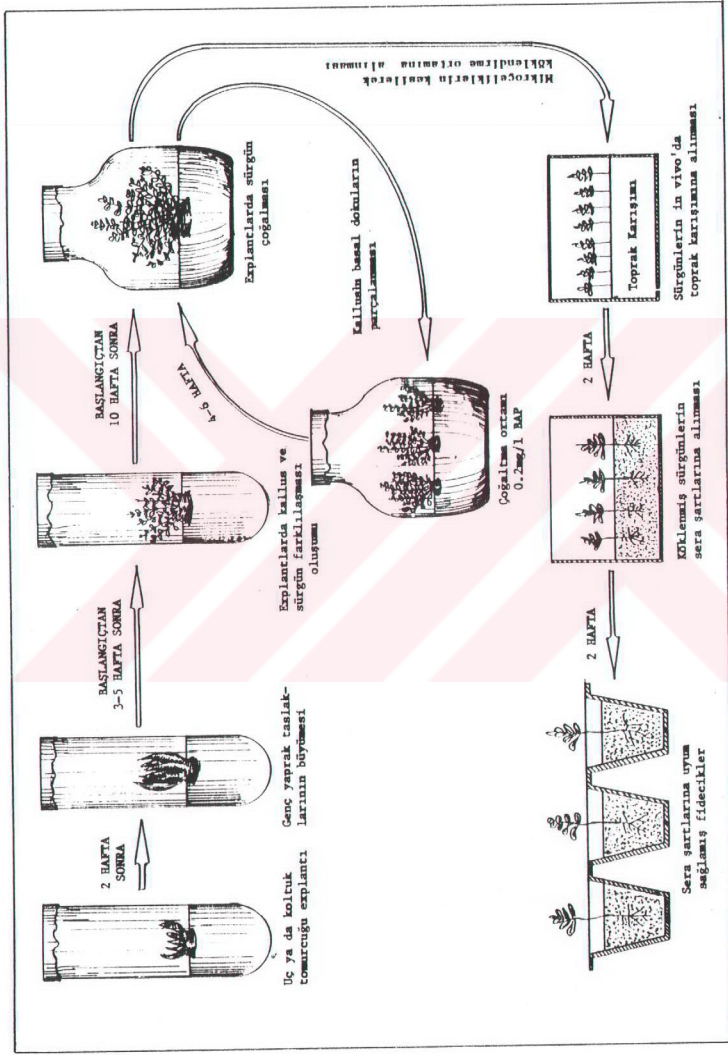


Şekil 46 : Kasaya Şaşırtılmış Mikroçeliklerin Köklenmesi İle Birlikte Başlangıçtan 1.5 Ay Sonraki Gelişme Durumu



Şekil 47 : Titrek Kavakta Doku Kültürü İle Üretilen 1 Yaşındaki Fidanların Görünüşü

Titrek kavakta eksplantların kültüre alınmasından itibaren, fidecik elde edilmesine kadar geçen evreleri gösteren akış şeması Şekil 48'de verilmiştir.



Şekil 48 : Titrak Kavakta Doku Kültürü ile Üretim Şeklini Gösteren Akış Şeması

3.2. Kafkas İhlamuru İle İlgili Bulgular

Üniversite Kampüsü içerisindeki kaffas ihlamuru ağaçlarından serbest tozlaşma ürünü tohumlar, renkleri yeşilden kahverengine dönüşmeden, bir başka deyişle tam olgulaşmadan, 25 - 30 Ağustos 1992, 4 - 6 Ağustos 1993 ve 25 - 30 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanmıştır. Toplanan tohumlar, denemeler sonuçlandırıluncaya kadar + 4°C' de saklanmıştır.

Tohumların kabukları soyularak embriyolar çıkarılmıştır. Endosperm-lerin gerekli sterilizasyon işlemlerine tabi tutulmasından sonra, embriyolar izole edilerek, embriyoların kotiledonları ortama temas edecek şekilde kültür tüplerine yerleştirilmiştir.

3.2.1. Sakkaroz Dozlarının Embriyo Gelişimine Etkisi

Kültür ortamlarındaki embriyoların gelişmesi üzerine sakkarozun etkisini belirlemek amacıyla, 4 farklı sakkaroz dozu (10, 20, 30 ve 40 g/l) ortamlara eklenmiştir.



Şekil 49 : İzole Edilmiş Kafkas İhlamuru Embriyolarının Görünüşü

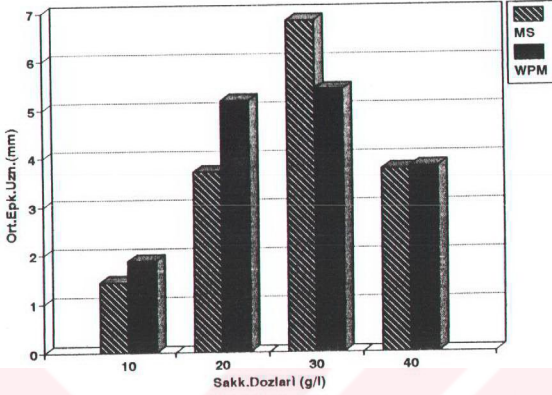
25 - 30 Ağustos 1992 tarihleri arasında toplanan tohumların izole edilen embriyoları (Şekil 49), kültüre alındıklarından itibaren 30 gün süreyle gözlenmiştir. 4 farklı sakkaroz dozunda da embriyolar kültüre alındıktan 7 - 8 gün sonra, kotiledonlar yeşillenmeye, radikulalar uzamaya başlamıştır. Embriyoların gelişerek ana kök ouşturmasından sonra; 20, 30 ve 40 g/l sakkaroz ilave edilen kültür ortamlarında, ana kökten kılcal yan kökler oluşmuştur. Sakkarozun 10 g/l yoğunlukta eklendiği kültür ortamlarındaki kök gelişimleri zayıf olmuş, ana kök gelişiminden sonra, kılcal yan kökler oluşmamıştır. Embriyoların kültüre alınmasından 30 gün sonra, tüm sakkaroz dozlarında epikotil uzunlukları ve kök uzunlukları ölçülerek ortalama epikotil ve ortalama kök uzunlukları belirlenmiştir. Ortalama değerler Tablo 22'de verilmiş ve Şekil 50 ve 51'de gösterilmiştir.

Tablo 22 : MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Gelişme Durumları

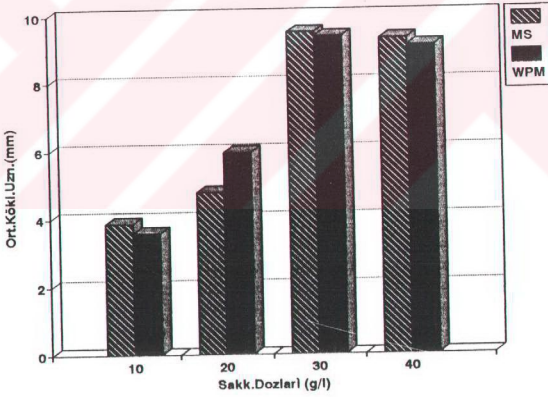
Sakkaroz Dozları (g/l)	Ort. Epik. Uz. (mm)		Ort. Kök Uz (mm)	
	(MS)	(WPM)	(MS)	(WPM)
10	1.44	1.88	3.85	3.58
20	3.70	5.17	4.77	5.95
30	6.82	5.40	9.50	9.37
40	3.75	3.80	9.30	9.08

Tablo 22, Şekil 50 ve 51 incelendiğinde görüleceği gibi, sakkaroz dozlarının 10 g/l'dan 30 g/l'a kadar artırılması hem MS ve hem de WPM ortamlarında epikotil uzunluğunu artırmıştır. Sakkaroz dozunun 40 g/l'a çıkarılması, epikotil uzunluğunda düşüşe neden olmuştur. Her iki ortamda da en yüksek ortalama epikotil ve ortalama kök uzunluğu 30 g/l sakkarozun eklendiği ortamlarda gerçekleşmiştir.

Sakkaroz dozları arasında epikotil uzunluğu ve kök uzunluğu bakımından gerek MS ve gerekse WPM ortamlarında oluşan farklılıkların istatistiksel kontrolünü yapmak için varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 23'de verilmiştir.



Şekil 50 :MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Epikotil Uzunlukları (Kültüre Alındıktan 30 Gün Sonra)



Şekil 51 : MS ve WPM Ortamlarında Embriyoların Farklı Sakkaroz Dozlarındaki Kök Uzunlukları (Kültüre Alındıktan 30 Gün Sonra)

Tablo 23 : Farklı Sakkaroz Dozlarında Kültüre Alınan Embriyolarda, Kültürden 30 Gün Sonra Elde Edilen Değerlerin İstatistiksel Denetimlerine Alt Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

İncelenen Özellik	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F - Oranı	Olasılık	Duncan Testi Sonuçları*			
							II	III	IV	
Epikoti	İşlemler	550	1	550	.230	.6377	I	2	2	2
Uzunl.	Dozlar	248.387	3	82.795	34.609	.0000	II		2	0
	Etkileşim	25.228	3	8.409	3.515	.0180	III			1
	Hata	234.444	98	2.392						
	Toplam	526.415	105							
Kök	İşlemler	2.430	1	2.430	.359	.5573	I	2	2	2
Uzunl.	Dozlar	360.465	3	120.155	17.749	.0000	II		2	2
	Etkileşim	1.516	3	.5053	.075	.9734	III			0
	Hata	480.653	98	6.769						
	Toplam	847.406	105							

* : Duncan Testi Sonuçları

0 = İstatistiksel olarak önemli farklılık belirlenmemiştir.

1 = Fark 0.05 yanılımla önemlidir.

2 = Fark 0.01 yanılımla önemlidir.

I = 10 g/l sakkaroz

II = 20 g/l sakkaroz

III = 30 g/l sakkaroz

IV = 40g/l sakkaroz

Tablo 23 incelendiğinde görüleceği gibi farklı sakkaroz dozlarında kültüre alınan embriyolardan elde edilen değerlerin varyans analizi sonuçlarına göre, ortamlar (MS ve WPM) bazında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Sakkaroz dozlarına göre ise, kuvvetli düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Sakkaroz dozları arasındaki farklılıkları ortaya koymayı amaçlayan Duncan testi sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir :

Epikotil uzunluğu bakımından 20 g/l sakkaroz dozu 10 g/l sakkaroz dozuna göre 0.01 yanılma ile farklı bulunmuştur. Yine 30 g/l sakkaroz dozunun, 10 g/l sakkaroz dozuna göre ve 40 g/l sakkaroz dozunun, 10 g/l sakkaroz dozuna göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu belirlenmiştir. 30 g/l sakkaroz dozunda oluşan epikotil uzunluğunun, 20 g/l sakkaroz dozuna kıyasla 0.01 yanılma ile daha fazla olduğu, 30 g/l sakkaroz dozunda oluşan epikotil uzunluğunun ise 40 g/l sakkaroz eklenen ortamda oluşan epikotil uzunluğuna göre 0.05 yanılma ile farklılık gösterdiği bulunabilmiştir. 40 g/l sakkaroz dozu ile 20 g/l sakkaroz dozunda istatistiki anlamda bir farklılık belirlenmemiştir.

Kök uzunluğu bakımından, 20 g/l sakkaroz dozu ile 10 g/l sakkaroz dozu arasında, 30 g/l sakkaroz dozu ile 10 g/l sakkaroz dozu arasında ve 40 g/l sakkaroz dozu ile 10 g/l sakkaroz dozu arasında 0.01 yanılma ile 20,

30 ve 40 g/l sakkaroz dozları lehine farklılıklar tespit edilmiştir. 30 g/l sakkaroz dozunun, 20 g/l sakkaroz dozuna göre ve 20 g/l sakkaroz dozunun, 40 g/l sakkaroz dozuna göre 0.01 yanılma ile farklı olduğu belirlenmiştir. 40 g/l sakkaroz dozu ile 30 g/l sakkaroz dozları arasında ise anlamlı farklılık bulunamamıştır.

3.2.2. BAP ve IBA Dozlarının Embriyo Gelişimine Etkisi

Bitki beslenme ortamlarına, BAP ve IBA ayrı ayrı 0.1 mg/l ve 0.2 mg/l dozlarında eklenerek 25 - 30 Ağustos 1992 tarihinde toplanan tohumların embriyoları kültüre alınmışlardır. Bu ortamlara sakkaroz 30 g/l olarak eklenmiştir.

Embriyoların BAP ilave edilerek kültüre alındığı ortamlarda kotiledonlarda ilk haftadan itibaren yeşillenme olmaksızın renk değişikliği olmuş ve sararmalar görülmüştür. Radikülalarda uzama olmamıştır. Kotiledonlar, embriyoların kültüre alınmasından 30 gün sonra kahverengine dönüşmüş, gelişme olmamış ve embriyolar ölmüştür (Şekil 52).



Şekil 52 : Embriyoların Kültüre Alınmasından 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarında Embriyo Gelişimi (Soldakiler 0.2 mg/l BAP' ılı, Ortadakiler 0.2 mg/l IBA'ılı, Sağdakiler ise 30 g/l Sakkarozlu Ortamdaki Gelişmeyi Göstermektedir.)

Embriyoların, IBA ilave edilerek kültüre alındığı ortamlarda ise, kültürden 10 gün sonra kotiledonlar büyümeye ve yeşillenmeye başlamış, bazı hipokotillerde uzama olmasına karşın ana kök gelişimi gerçekleşmemiştir. Kültürden 30 gün sonra IBA içeren ortamlarda kültüre alınan embriyoların hiç birinde farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlenmiştir. Embriyo kotiledonları sarımsı yeşil renge dönüşmüştür (Şekil 52).

3.2.3. Tohumların Farklı Toplama Zamanlarının 30 g/l Sakkaroz Ortamında Embriyo Gelişimine Etkisi

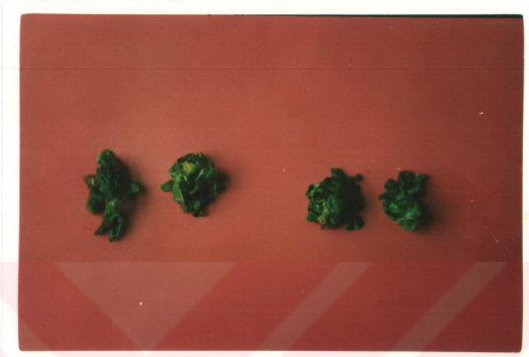
Tohumlar, 4 - 6 Ağustos 1993 ve 25 - 30 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanarak deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmışlardır. 4 - 6 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumlar açılarak yapılan gözlemlerde, endospermin tamamiyle sertleşmediği ve endospermin içinin sıvımsı beyaz olduğu, embriyonun ve kotiledonlarının endosperm tarafından sarılmadığı ve kotiledonlarının küçük olduğu görülmüştür. 25 - 30 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumların ise, sakkaroz BAP ve IBA denemelerinde kullanılan ve aynı zaman dilimi içerisinde toplanan tohumlarda olduğu gibi, endospermilerin katı ve gevrek beyaz bir yapı kazandığı ve kotiledonlarının endosperm tarafından sarılmış olduğu görülmüştür.

Tohumların kabukları soyularak endospermiler çıkarılmıştır. Endospermiler gerekli sterilizasyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra, embriyolar izole edilerek embriyoların radikulları ortama temas edecek şekilde kültür tüplerine yerleştirilmişlerdir.

4 - 6 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarında, kültüre alındıktan 7 - 8 gün sonra kotiledonlar yeşillenmeye ve büyümeye başlamıştır. Kültürden 2. ve 3. haftalarda yapılan gözlemlerde, kotiledonların tamamiye yeşillendiği ve büyüdüğü, hipokotillerin çok az oranda uzama yaptığı ve epikotil farklılaşmasının olmadığı görülmüştür. Kültürden 30 gün sonra hem MS ve hem de WPM ortamlarında kotiledonların tamamiye yeşillendiği, büyüdüğü, ancak epikotil farklılaşmasının gerçekleşmediği gözlenmiştir (Şekil 53).

25 - 30 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarında kültüre alındıktan 7 - 8 gün sonra kotiledonlar yeşillenmeye, hipokotiller uzamaya başlamıştır. Embriyoların gelişerek ana kök

oluşturmasından sonra, ana kökten kılcal yan kökler oluşmuştur. Embriyoların kültüre alınmasından 30 gün sonra, hem MS ve hem de WPM ortamlarında epikotil ve kök farklılaşması gerçekleşmiştir (Şekil 54).



Şekil 53 : 3 - 5 Ağustos 1993 tarihleri arasında Toplanan Tohum Embriyolarının Kültürden 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarındaki Gelişme Durumu

3.2.4. Bitkiciklerin Sera Koşullarına Uyum Çalışması

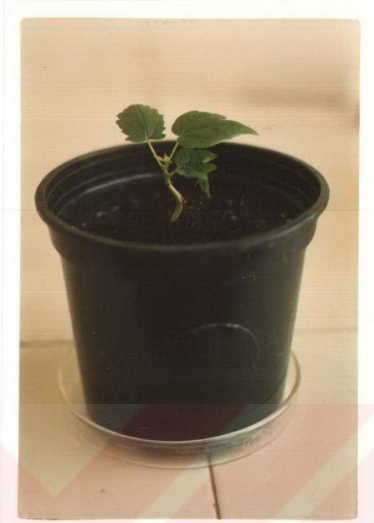
Embriyoların kültüre alınmasından 30 gün sonra epikotil ve kök farklılaşmasının gerçekleştiği sakkarozlu ortamlardaki kafkas ıhlamuru fidecikleri kültür tüplerinden çıkartılarak kök kesimi yapıldıktan sonra, 1 : 1 oranında turba : kum karışımı içeren saksılara şaşırtılmışlardır. Üzerleri şeffaf kaplarla kapatılarak 18 - 20°C sıcaklık ve % 80 - 90 rutubet içeren ortamda 15 gün süreyle bekletildikten sonra (Şekil 55) üzerlerindeki şeffaf kaplar uzaklaştırılarak, sera koşullarına alınmışlardır (Şekil 56). Fidecikler 1 ay süreyle sera koşullarında bekletildikten sonra sera dışına alınmışlardır. Sera dışında bir kış dönemi geçiren tüplü fidanlar vejetasyon döneminin başlaması ile birlikte, büyüme faaliyetlerine devam etmişlerdir (Şekil 57).



Şekil 54 : 25 - 30 Ağustos 1993 Tarihleri Arasında Toplanan Tohum Embriyolarının Kültürden 30 Gün Sonra MS ve WPM Ortamlarındaki Gelişme Durumu



Şekil 55 : Şaşırtılmış ve Üzerleri Şeffaf Kaplarla Örtülmüş Kafkas İhlamuru Fidecikleri

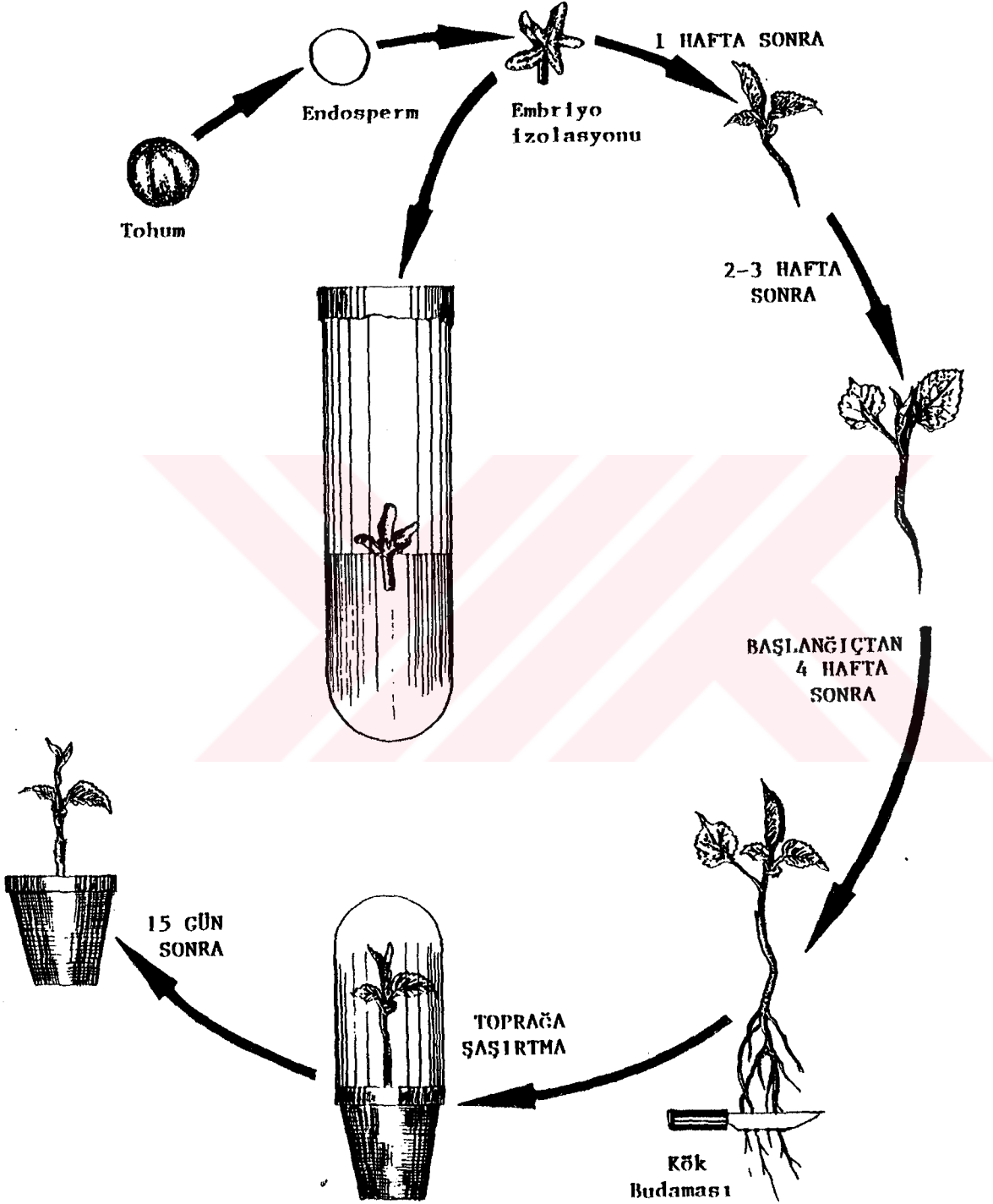


Şekil 56 : Saksıya Şaşırtılmış Kafkas İhlamuru Fideciğinin Şaşırtmadan İki Hafta Sonraki Görünüşü



Şekil 57 : Kafkas İhlamurunda 1 Yaşındaki Fidanların Görünüşü

Kafkas ıhlamurunda embriyoların kültüre alınmasından, fidecik elde edilmesine kadar geçen evreleri gösteren akış şeması Şekil 58' de verilmiştir.



Şekil 58 : Kafkas ıhlamurunda Embriyo Kültürü ile Üretim Şeklin Gösterir Akış Şeması

4. İRDELEME VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışma kapsamına giren titrek kavakta; farklı sakkaroz, BAP, BAP + IBA, kinetin ve kinetin + IBA doz ve kombinasyonlarının ve bunların eklendiği MS ve WPM adlı iki farklı temel besin ortamının, in vitro sürgünlerde sürgün oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkileri ve bu denemelerin sonucunda iyi gelişme gösteren ortamlarda, farklı ortetlere ait tomucuk eksplantlarının sürgün oluşturma durumları ve tüm denemeler boyunca elde edilen sürgünlerin, köklendirilmesi yolları araştırılmıştır. Kafkas ıhlamurunda ve diğer farklı zamanlarda toplanan tohumlara ait embriyoların, in vitro sürgünlerde farklı sakkaroz, BAP ve IBA dozlarındaki, gelişimi ve fidecik oluşumundaki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara ait tartışmalar aşağıda verilmiştir.

4.1. Titrek Kavakla İlgili Bulguların İrdelenmesi ve Değerlendirilmesi

Elde edilen bulgulara göre farklı sakkaroz dozlarının, kültüre alınan tomucuk eksplantlarında, sürgün çoğalması bakımından tek başına etkili olmadığı görülmüştür. Hem MS ve hem de WPM ortamlarında birer sürgün gelişmiş, bunlar daha sonra sararmış ve ölmüştür. Ancak gelişmeler, 20 ve 30 g/l sakkarozun eklendiği ortamlarda daha iyi düzeyde gerçekleşmiştir. Douglas (63) *Populus trichocarpa* x *Populus tacamahaca* hibridi, Sharma ve arkadaşları (110) *Morus alba* L.'da yaptıkları benzer çalışmalarında sürgün oluşumunu sağlamak bakımından tek başına yeterli olmamakla birlikte en iyi sakkaroz dozunun, 30 g/l olduğunu belirterek, bu dozlardaki artışların ya da sürgünlerin sürgün oluşumunu azalttığını vurgulamaktadırlar.

Bizim çalışmamızda, BAP ve BAP + IBA doz ve kombinasyonlarının eklendiği MS ve WPM ortamlarında en iyi gelişmeler, WPM ortamlarında görülmüştür. Sürgün farklılaşması ve çoğalması yalnızca, WPM ortamına farklı dozlarda (0.2 - 2.0 mg/l) BAP eklendiğinde gerçekleşmiştir. BAP + IBA birlikte eklenerek test edildiği ortamlarda, sürgün oluşumu ve gelişimine yönelik bir gelişme olmamış, IBA'nın tek başına ve BAP dozları ile birlikte 30 mg/l olarak eklenmesiyle, tomucuk eksplantlarında sürgün oluşumu

gerçekleşmemiştir. BAP eklenen ortamlarda kültüre alınan tomucuklarda, 3 hafta sonra sürgün farklılaşması görülmüştür. BAP dozlarının 0.2 mg/l'dan 2.0 mg/l' a kadar artırılmasına bağlı olarak, eksplantlarda oluşan sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve sürgünlerdeki nod sayısında azalma olmuştur. Tablo 14 ve 15 incelendiğinde görüleceği gibi, sürgün sayısı, uzunluğu ve sürgünlerdeki nod sayısı bakımından en iyi sonuçlar, 0.2 mg/l BAP eklenen ortamda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l BAP dozları izlemiş ve bu sonuçların istatistiki düzeyde de anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle sürgün oluşumu görülen tomurcuk eksplantlarının, daha sonraki çoğaltma aşamasında 0.2 mg/l BAP dozu kullanılmış ve kültür başlangıcından 10 hafta sonra, çoğaltma aşaması için eksplantlar, WPM + 0.2 mg/l BAP dozunda kültüre alınmaya devam edilmiştir. BAP ve IBA'nın birlikte eklendiği MS oramlarında ise sürgün oluşumu ve gelişimine yönelik bir gelişme olmamıştır. BAP'lı ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda başlangıçta gelişme olmasına karşın, daha sonra eksplantlarda sararmalar ve kahverengileşmeler görülmüştür. BAP + IBA'lı ortamlarda ise eksplantlarda herhangi bir gelişme olmaksızın, yapraklarda kahverengileşmeler olmuştur. Bu araştırmada, WPM ortamındaki BAP ve BAP + IBA dozlarının sürgün oluşumu ve gelişimine olan etkilerine bakıldığında, BAP'ın tek başına eklendiğinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar literatür bilgileriyle karşılaştırılacak olursa, BAP dozunun etkisinin bitki türlerine göre değişmekte olduğu, bazı türlerde ise BAP'ın IBA ya da NAA'nın 0.1 mg/l ya da daha düşük dozlarıyla birlikte test edildiğinde yine sürgün oluşumunun gerçekleşebildiği görülecektir. Nitekim, Bagnaresi ve Minotta (58) tarafından *Populus alba* L., *Populus tremula* L. ve *Populus canescens* (Aiton) Sm. gibi üç farklı kavak türünde, ortama 0.2 mg/l BAP'ın eklenmesiyle, sürgün çoğalmasında en iyi sonucun elde edildiği belirtilmektedir. Yine Ahuja (59) tarafından, *Populus tremula* L. ve *Populus tremuloides* Michx.'de yapılan benzer çalışmada, tomurcuk meristemleri, ilk önce 0.4 - 0.5 mg/l BAP ve bunu izleyen aşamada 0.0.2 mg/l NAA'lı ortamda kültüre alınarak sürgün çoğalması sağlanırken, daha sonraki çalışmasında (60), bu iki aşamalı sistem kaldırılarak, BAP ve NAA aynı dozlarda birlikte eklenerek, sürgün çoğalması sağlanmıştır. Whitehead ve Giles (61) tarafından *Populus* spp. türlerinde yapılan aynı nitelikli başka bir çalışmada, 0.2 mg/l BAP eklenen ortamda tomurcuk dormansisinin 4 haftada kırıldığından bahisle, sürgün çoğalmasının sağlanması için 0.1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA'nın birlikte gerekli olduğu belirtilmektedir. Xu (64) ise

Populus davidiana Dode.'da 0.5 mg/l BAP ve 0.02 mg/l ya da 0.05 mg/l NAA'lı ortamda sürgün farklılaşmasının gerçekleştiğini bildirmektedirler. Yine Youn ve ark. (73) *Tilia sordata* Mill.'da sürgün çoğalmasının 0.2 mg/l BAP'lı ortamda, Biondi ve ark. (88) *Castanea sativa* Mill.'da sürgün farklılaşmasının 0.5 mg/l BAP'lı ortamda, Cornu ve Chaix (113) *Prunus avium* L.'da iyi bir sürgün oluşumunun 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA'lı ortamda sağlandığını ortaya koymuşlardır. Bu durumda tarafımızdan elde edilen araştırma sonuçlarına göre; titrek kavakta, IBA'nın 0.1 mg/l dozunda, sürgün oluşumunda engelleyici bir etki yaptığı ve BAP'ın tek başına eklendiğinde, özellikle de 0.2 mg/l BAP dozunun sürgün çoğalmasında daha etkili olduğu söylenebilir.

Yukarıda açıklanan bulgulara bakıldığında; temel besin ortamı açısından WPM ortamının, sürgün oluşumu ve gelişimi bakımından MS ortamına göre daha etkili olduğu, MS ortamının bu etkiyi göstermediği anlaşılmaktadır. Nitekim, bazı araştırmalarda farklı temel besin ortamlarının, aynı bitki büyüme düzenleyicisinin eklenmesi durumunda benzer etkiyi göstermediği, ortaya konmuştur. Buna göre; Sellmer ve ark. (66) 5 farklı kavak klonunda, Chalupa (71) *Quercus robur* L. ve *Tilia cordata* Mill.' da, San - Jose ve ark. (81) *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.'da ve Ide ve Yamamoto (102) *Betula maximowicziana* Regel.'da farklı temel besin ortamlarının sürgün oluşumundaki etkilerini de araştırdıkları çalışmalarında, her temel besin ortamının, sürgün oluşumu ve gelişiminde aynı etkiyi göstermediği, hatta bazılarının o bitki türü için hiç etkili olmadığından sözetmektedirler.

Mevcut çalışmamızda, kinetin ve kinetin + IBA doz ve kombinasyonlarının eklendiği MS ve WPM ortamlarında; tomurcuk eksplantlarının kütüre alınmasından itibaren 10. haftaya kadar, sürgün oluşumuna yönelik bir gelişme görülmemiştir. WPM ortamlarında, eksplantların genç yaprak taslaklarında başlangıçta yeşillenme olmasına karşın, daha sonra bu yapraklarda kahverengileşme olmuştur. Bu denemelerden elde edilen bulgulardan, kinetinin titrek kavakta sürgün oluşumunda etkili bir sitokin olmadığı sonucuna varılabilmektedir. Bu durum sürgün oluşumu bakımından, BAP'ın etkili olduğu ancak, kinetinin ise gerekli etkiyi yapmadığını ortaya koymaktadır. Kinetinin sürgün oluşumu üzerindeki etkisini ortaya koymayı amaçlayan çeşitli araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve kinetinin sürgün oluşumunda etkili bir sitokin olmadığı belirlenmiştir. Chalupa (71) *Quercus robur* L. ve *Tilia cordata* Mill.'da yaptığı

çalışmada, kinetinin sürgün oluşumunda etkili olmadığından bahsetmektedir. Barghıçı (94) *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel.'de yine kinetinin sürgün oluşumunda etkili olmadığını belirtmektedir. Ohyama ve Oka (109) *Morus* spp.'larda tomurcukların gelişmesinde Kinetinin etkili olmadığını ve aynı şekilde Trindade ve ark. (121) da, *Eucalyptus globulus* Labill.'da, kinetinin sürgün gelişiminde etkili bir sitokinin olmadığını belirlemişlerdir.

Farklı ortetlere ait tomurcuk eksplantlarının in vitroda WPM + 0.2 mg/l BAP ve WPM + 0.5 mg/l BAP ortamındaki gelişme tepkilerini belirlemek için yapılan denemeler sonucunda elde ettiğimiz bulgular, eksplantların alındığı bireye bağlı olarak, oluşan sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı bakımından farklılıkların olduğunu (Tablo 16 ve 18) göstermiştir. Sürgün farklılaşma sürelerinde de ortetlere göre farklılıklar saptanmıştır. Dozlar bazında ise (0.2 ve 0.5 mg/l BAP) ilk deneme sonuçlarından elde edilen bulgularla benzer sonuçlar alınmıştır. Yani 0.2 mg/l BAP dozunun, 0.5 mg/l BAP dozuna göre (Tablo 20), istatistiksel düzeyde daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Tablo 1'de verilen O7 nolu ortetin explantlarında ise sürgün farklılaşması, çok zayıf düzeyde olmuş, sürgün gelişimi görülmemiştir. Tablo 17 ve 19 incelendiğinde eksplantların alındığı ortetlere bağlı olarak; sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve nod sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu görülebilecektir. Sürgün farklılaşmasının görüldüğü tüm eksplantlar kültür başlangıcından 10 hafta sonra, daha sonraki sürgün çoğaltılmasını sağlamak için, WPM + 0.2 mg/l BAP ortamında kültüre alınmaya devam edilmiştir. Bu konu ile ilgili olarak yapılan benzer çalışmalarda da ortete bağlı olarak gelişme farklılıklarının olduğu belirtilmektedir. Ahuja (60) *Populus tremula* L. ve *Populus tremuloides* Michx.'de, tomurcuk meristemlerinin kültüre alındığı çalışmasında, klonla bağlı olarak sürgün oluşum sürelerinde farklılıkların görüldüğünü bildirmektedir. Rutledge ve Douglas (65) 12 ticari kavak klonunda yapmış oldukları çalışmalarında, ortetlerin genotiplerinin, sürgün oluşumunda ve gelişiminde, besin ortamından daha fazla etkili olduğunu açıklamaktadırlar. Yine Coleman ve Ernst (67) de *Populus deltoides* Marsh.'de sürgün oluşumunda, genotipin etkisinden bahsetmektedirler. Davis (107) ise *Robinia pseudoacacia* L.'nın 5 farklı klonundan elde ettiği tomurcukları eksplant olarak kullandığı araştırmasında, yalnızca 2 klonun eksplantlarının sürgün çoğalması sağladığını gözlemiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara ve verilen literatür bilgilerine bakıldığında, sürgün oluşumu ve çoğalmasında, eksplantların alındığı ortetlerin önemli bir etkiye sahip

olduğu, dolayısıyla da in vitro'da sürgün oluşumu ve çoğalmasında, sitokinin çeşitinden başka genotipin de, dikkate alınması gereken önemli bir etken olduğu anlaşılmaktadır.

Bu araştırma kapsamında in vitro'da farklı ortetlerden elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için; in vitro ve in vivo'da olmak üzere iki farklı köklendirme yöntemi denenmiştir. In vitro'da köklendirmede; WPM ortamının 1/2 ve 1/4 dozlarına IBA ve NAA (NAA sabit tutularak) değişik oranlarda eklenmiştir. IBA ve NAA'nın değişik dozlarda eklendiği 1/2 WPM ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde, köklenme gerçekleşmemiş, sürgünlerin bazal uçlarında yalnızca şişme ve kallus oluşumları görülmüştür. 1/4 WPM ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde, IBA ve NAA (NAA sabit tutularak) dozlarına göre değişen (% 36.66 - 75.0) yüzdelerde köklenmeler olmuştur (Tablo 21). Köklenmeler 10. günden itibaren başlamış ve 1 ay sonra değerlendirmeye alınmıştır. In vivo'da köklendirme şeklinde, 3.1.8 başlığı altında anlatıldığı üzere, in vitro'da farklı ortetlerden elde edilen sürgünler, üç farklı işlemde geçirilerek, yine aynı başlık altında açıklanmış olan toprak karışımına alınmışlardır. Her üç işlemde de köklenme 8. günden itibaren başlamış ve 15. gün sonunda %100 köklenme oranına ulaşılmıştır. In vitro'da ve in vivo'da köklendirme şekli pek çok ağaç türü için yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur. In vitro'da köklendirmeye ilgili olarak yapılan çalışmalarda; Ahuja (59, 60) *Populus tremula* ve *Populus tremuloides* Michx.'da IBA ve NAA'yı birlikte ekleyerek, Chalupa (71) *Quercus robur* L. ve *Tilia cordata* Mill'da 1/2 oranındaki ortamlara IBA ve NAA'yı ekleyerek sürgünlerin köklenmesini sağlamışlardır. Meier - Dinkel (114) *Prunus avium* L.'da, in vitro'da elde edilen sürgünlerin köklendirilmesini, IBA ve NAA ilaveli 1/3 oranındaki ortamlarda gerçekleştirmiştir. Warrag (119) *Eucalyptus grandis* (Hill.) Maiden.'de yaptığı çalışmada, sürgünlerin köklendirilmesini 1/4 oranındaki ortama IBA ekleyerek gerçekleştirmiştir. In vivo'da köklendirme şeklinde ise, araştırma sonucunda elde edilen bulgulara benzer sonuçlar bazı türlerde yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir. Chalupa (57) ve Ahuja (60) bazı kavak türlerinde, in vitro'da elde ettikleri sürgünleri in vivo'da köklendirdiklerini bildirmektedirler. Barghıçı (94) *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel.'da sürgünleri IBA solüsyonunda beklettikten sonra, topraklı ortamda köklendirmiştir. Struve ve Lineberger (100) *Betula papyrifera* Marsh.'da sürgünlerin, turba : vermikülit karışımında köklendirildiğini açıklamaktadırlar. Yine Burger ve ark. (127) *Paulownia tomentosa* Steud.'da ve Preece ve ark.

(128) *Fraxinus* spp. türlerinde sürgünlerin, hem in vitro'da hem de in vivo'da köklenmesini sağlamışlardır. Her iki ortamdaki köklenme şekli kıyaslanacak olursa, in vivo'da köklendirmenin daha başarılı ve optimum olduğu görülmektedir. Öte yandan in vivo'da köklendirme şeklinde, mikrovegetatif üretim tekniğinde bir adım kısaltılmış ve böylece ekonomik açıdan, in vitro'da fidecik elde edilmesine göre, daha az masrafla bu iş gerçekleştirilebilecektir.

4.2. Kafkas İhlamuru İle İlgili Bulguların İrdelenmesi ve Değerlendirilmesi

25 - 30 Ağustos 1992 tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarının kültüre alındığı farklı sakkaroz (10, 20, 30 ve 40 g/l) dozlarındaki embriyolardaki gelişme sonuçlarına göre; gerek MS ve gerekse WPM ortamlarında gelişmeler iyi düzeyde olmuştur. Embriyoların gelişerek fidecik oluşturmaya karşın, bu gelişmenin her iki besin ortamında da 30 g/l sakkaroz dozunda daha iyi olduğu gözlenmiştir (Tablo 22, Şekil 50 ve 51). Gelişmedeki bu farklılıkların dozlar arasında önemli olduğu, besin ortamları arasında ise önemli farklılık olmadığı istatistiksel olarak da ortaya konmuştur (Tablo 23). Kültüre alınan embriyoların yaşama ve büyümesinin büyük ölçüde, ortama karbonhidratların eklenmesine bağlı olduğu ve embriyo kültüründe genellikle karbon enerji kaynağı olarak sakkaroz kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda glukoz ve fruktozun da uygun olabileceği genel bir ifadeyle belirtilmektedir (25, 31). Jay - Allemand ve Cornu (154) *Juglans regia* L. embriyolarında, epikotil ve kök gelişiminin, ortama değişik dozlarda sakkaroz eklenmesiyle gerçekleştiğini, ancak en iyi dozun 20 g/l sakkaroz olduğunu bildirmektedirler. Sharma ve Thorpe (110) *Morus alba* L.'da embriyoları, 30 g/l sakkaroz ortamında kültüre alarak çimlenmesini ve fidecik oluşturmaya sağlamışlardır. Bulard ve Monin (145) ise *Fraxinus excelsior* L.'in embriyo kültüründe temel besin ortamına hormon eklemeksizin 30 g/l glukozun eklenmesiyle bitki rejenerasyonu sağlandığını ortaya koymuşlardır. Yukarıda açıklandığı gibi, Kafkas İhlamurunda tarafımızdan kurulan denemelerde, bitki büyüme düzenleyicileri eklemeksizin, sadece sakkarozun bulunduğu ortamlarda, fidecik oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Bu durumda sakkarozun, embriyoların çimlenip fidecik oluşturmada oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir.

Bu araştırma kapsamında, embriyoların BAP ve IBA ilave edilerek kültüre alındığı ortamlarda, epikotil ve kök farklılaşması, dolayısıyla fidecik oluşumu görülmemiştir. BAP'lı ortamlarda kültüre alınan embriyolarda kahverengileşmeler olmuş, IBA'lı ortamlarda, kotiledonlarda yeşillenme olmasına karşın epikotil ve kök farklılaşması görülmemiştir. BAP ve IBA dozlarının test edildiği ortamlarda, embriyoların gelişme göstermemesi nedeniyle, bu dozlarda BAP ve IBA'nın, embriyoların gelişerek fidecik oluşturmasında engelleyici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Nitekim, genel bir deyişle bitki büyüme düzenleyicilerinin, kültüre alınan embriyoların büyümesi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu ve söz konusu etkinin bitki büyüme düzenleyicisinin türüne, dozuna ve üzerinde çalışılacak bitki türüne bağlı olarak, hem geliştirici ve hem de engelleyici olabildiği belirtilmektedir (31). Vieitez ve Vieitez (147) *Castanea sativa* Mill.'nin embriyolarını 2.0 mg/l BAP eklenen ortamda kültüre aldıklarında bitki rejenerasyonunu sağlamışlardır. Bellarosa (149) *Quercus suber* L. embriyolarını BAP ve NAA'lı bir ortamda kültüre aldıklarında, embriyoların çimlenerek normal fidecikleri oluşturabilmeleri için, NAA'nın ortamdaki uzaklaştırılmasının gerekli olduğunu bildirmektedirler. Yine *Quercus suber* L.'da Deidda ve ark. (150) tarafından yapılan bir başka benzer çalışmada, BAP'lı ortamda embriyoların, iki hafta içinde çimlendiği belirtilmektedir. Yine Chalupa (76) *Sorbus aucuparia* L.'da, izole edilen embriyoların BAP ve IBA'yı birlikte içeren ortamlarda kültüre alınması durumunda çimlenerek 6 - 8 hafta içerisinde sürgün vermeye başladığını vurgulamaktadır. Cossio ve Minolta (155) ise *Juglans regia* L.'da kültüre alınan embriyoların, büyümesi ve gelişmesi üzerinde BAP'ın istenmeyen bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Mevcut araştırmamızda elde edilen bulgular ve literatür bilgileri kıyaslandığında şunları söylemek mümkündür :

Embriyoların gelişmesinde sitokinin ve oksinler tek tek ya da birlikte ortama eklendiklerinde, bitki türünün genetik yapısına ya da isteklerine bağlı olarak, hem olumlu hem de olumsuz etki yapabilmektedir. Nitekim bu çalışmada kaffas ıhlamurunda gerek BAP ve gerekse IBA, denemelerde kullanılan dozlarda embriyoların gelişmesinde olumsuz etki yaparken, literatür bilgilerinde açıklandığı üzere olumlu gelişmelerin elde edildiği bitki türleri de vardır.

Sakkarozlu ortamlarda embriyoların gelişerek fidecik oluşumunun görülmesi nedeniyle bu kez bu denemelerin kurulmasından 1 yıl sonra tohumlar, 2 farklı zaman diliminde toplanarak, embriyoların en iyi gelişim

gösterdiği 30 g/l sakkaroz dozunda kültüre alınmışlardır. 4 - 6 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarında yeşillenme olmuş, hipokotillerde bir miktar uzama olmasına karşın, epikotil farklılaşması görülmemiştir. 25 - 30 Ağustos 1993 tarihleri arasında toplanan tohumların embriyoları, bir önceki yılda aynı tarihler arasında toplanan tohumların embriyolarıyla aynı gelişme özellikleri göstererek (bkz. 3.2.1.), epikotil ve kök farklılaşması, bir başka ifadeyle çimlenerek fidecik oluşumu göstermişlerdir. İki farklı sürede toplanan tohumların embriyolarındaki gelişme sonuçlarından anlaşılacağı gibi, 4 - 6 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarındaki gelişme, 25 - 30 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarına göre farklı olmuş ve fidecik oluşumu gerçekleşmemiştir. Bunun nedeninin, bu tarihte toplanan tohumların embriyolarının tam olarak olgunlaşmamasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Farklı tarihlerde toplanan bu tohumların endosperm ve embriyolarında morfolojik bakımdan da farklılıklar tespit edilmiştir (bkz. 3.2.3.). Pterik (25) genel bir deyişle, olgunlaşmış embriyoların kültürü için, mineraller ve şekerden oluşan agarlı katı bir besin ortamının, çoğu kez yeterli olabileceğini, oysa in vitro'da izole edilmiş olgunlaşmamış embriyoların kültüründeki başarının, embriyonun gelişmişlik safhasına bağlı olduğunu ve daha karmaşık bir ortamı gerektirdiğine işaret etmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doktora tezi olarak gerçekleştirilen bu çalışmada titrek kavak ve karkas ıhlamurunda; organ kültürü ve embriyo kültürü gibi iki farklı doku kültürü tekniği kullanılarak, bu türlerde fidan üretimi amaçlanmış ve yapılan denemelerde; titrek kavakta, değişik sitokinin (BAP ve kinetin) ve oksinlerin (IBA) doz ve kombinasyonlarının sürgün oluşumundaki etkileşimleri, farklı genotiplerin in vitro'da gösterdiği sürgün oluşumu ve çoğalmasına yönelik tepkiler ve sürgünlerin köklendirilmesi şekli araştırılmıştır. karkas ıhlamurunda ise, sakkaroz, sitokinin (BAP) ve Oksin (IBA) lerin, embriyoların çimlenerek fidecik oluşturmadaki etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında kurulan tüm denemelerde elde edilen sonuçlara bağlı olarak şekillenen önerileri, aşağıdaki şekilde belirtmek mümkündür :

A. Titrek Kavak İle İlgili Sonuç ve Öneriler

1. Titrek kavaktaki denemelerde kullanılan tomucukların alındığı sürgünlerin tamamı, vejetasyon dönemi dışında alınmıştır. Bu durum bize vejetasyon dönemi dışında alınan tomucukları başarılı bir şekilde kullanmanın mümkün olabileceğini göstermiştir.

2. Tomucuk eksplantlarının kültüre alınmasında karbon enerji kaynağı olarak kullanılan sakkarozun, 20 ve 30 g/l dozlarında daha iyi gelişim gösterdiği belirlenerek, sürgün oluşumu ve gelişimine yönelik tüm denemelerde 30 g/l sakkaroz dozu kullanılmıştır. Yapılacak olan çalışmalarda bu doz kullanılmaya devam edilmelidir.

3. Denemelerde kullanılan MS ve WPM adlı iki temel besin ortamından MS ortamı, sürgün oluşumu ve gelişiminde yeterince etkili olmamış, WPM ortamı ise arzulanan etkiyi sağlamıştır. Bu nedenle uygulamaya yönelik yapılacak çalışmalarda WPM adlı temel besin ortamı kullanılmalıdır.

4. Test edilen; BAP + IBA; kinetin ve kinetin + IBA doz ve kombinasyonlarında ise sürgün gelişimi görülmemiştir. BAP dozları içerisinde ise tomucuk eksplantlarında oluşan sürgün sayısı, uzunluğu ve

nod sayısı bakımından en iyi gelişim 0.2 mg/l BAP ortamında elde edilmiştir. Farklı ortetlerden elde edilen tomurcuklarla kurulan denemelerde de 0.2 mg/l BAP dozu, 0.5 mg/l BAP dozuna göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu nedenle yapılacak olan çalışmalarda bu dozun kullanılması daha faydalı olacaktır.

5. Farklı ortetlerden elde edilen tomurcuk eksplantlarındaki gelişmelere bakıldığında; ortete bağlı olarak, sürgün farklılaşma sürelerinde, sürgün sayıları, uzunlukları ve sürgünlerdeki nod sayılarında, aynı zaman periyodu esas alındığında, oldukça değişik gelişme farklılıklarının olduğu, bir ortete ait eksplantlarda sürgün oluşumunun çok zayıf düzeyde kaldığı görülmüştür. Ülkemizde titrek kavakla ilgili olarak gen kaynaklarının yerinde (in situ) ve kaynağının dışında (ex situ) korunması için 1993 yılından itibaren bir çalışmanın başlatıldığı ve bu türe ilişkin olarak biogenetik rezerv alanlarının seçilerek, korunmaya alındığı belirtilmektedir (16). Ancak bu alanların daha da genişletilmesi ve tüm titrek kavak doğal yayılış alanlarına kaydırılması ve buralarda çok fazla sayıda bireyin, fenotipik seleksiyona tabi tutulması yerinde olacaktır. Seçilmiş bu fertlerin in vitro'da göterecekleri çoğalma tepkileri belirlenerek, en iyi tepki gösteren fertlerin seçilmesi ile ıslah çalışmalarının birinci adımı başlatılmış olacaktır.

6. Çalışma kapsamında; in vitro'da elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için in vitro ve in vivo'da olmak üzere iki farklı yöntem denenmiştir. Denemeler sonucunda 4 : 1 : 1 oranında yaprak çürüğü : perlit : kum içeren toprak karışımının kullanıldığı in vivo'da köklendirme şeklinin kullanılması, doku kültürü ile üretimde, in vitro'da köklendirme aşamasını ortadan kaldıracaktır. Bunun sonucunda; fideciklerin elde edilme süreleri kısılacak, bunun da ötesinde ekonomik açıdan kıyaslandığında maliyetin düşmesine neden olacaktır. Bu durumda, uygulama çalışmalarında bu tekniğin kullanılması gerekli olmaktadır. Elde edilen fideciklerin dış ortama uyum sağlayabilmesi için, sürgünler toprak karışımına alındıklarında, 20 - 22 °C sıcaklık, normal gün ışığı ve % 80 - 90 rutubet koşullarında en az 15 gün süreyle bekletilmeli ve sonra normal sera koşullarına alınmalıdır. Burada da 15 gün süreyle bekletildikten sonra 2 : 1 oranında toprak : perlit karışımı içeren polietilen tüplere şaşırtılmalıdır.

5. madde de değinildiği üzere, fenotipik seleksiyonla seçilen ve in vitro koşullarda iyi bir farklılaşma ve büyüme tepkisi gösteren üstün nitelikli fertler ortaya çıkarılmalı ve bunlardan elde edilecek fidanlar, erozyona

duyarlı yamaç arazilerde ağaçlandırmalarda kullanılmalı ve ağaçlandırma projelerinde bu türe yer verilmelidir.

B. Kafkas İhlamuru İle İlgili Sonuç ve Öneriler

7. Değişik tarihler arasında toplanan tohumların embriyolarında, sakkaroz eklenen ortamlardaki gelişme farklılıklarına bakılacak olduğunda, 25 - 30 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarında, gelişme ve fidecik oluşumu gözlenirken, 4 - 6 Ağustos tarihleri arasında toplanan tohumların embriyolarında bu durum görülmemiştir. Bu değişik tarihler arasında toplanan tohumların endosperm ve embriyolarında toplandıkları anda bazı morfolojik farklılıkların olduğu anlatılmıştır (bkz. 3.2.3). Tohumların toplanacağı ortetlerin değişik yükseltilerde bulunması durumunda, tohumların olgunlaşma sürelerinde de farklılıklar olacaktır. Bu nedenle in vitro koşullarda, embriyodan fidecik elde etmek için yapılacak olan çalışmalarda, endosperm ve embriyolardaki olgunlaşma durumuna, bu ölçütler esas alınarak karar verilmeli ve buna göre tohum toplanarak, + 4 °C' de soğutucuda kullanılıncaya kadar saklamaya alınmalıdır.

8. Yapılan denemelerde elde edilen bulgular sonucunda fidecik oluşturma bakımından, en iyi sakkaroz dozunun 30 g/l olduğu belirlenmiştir. Bu gelişme durumu hem MS, hem de WPM temel besin ortamında benzer düzeyde olmuştur. Bu durumda, fidecik elde etmek için kültüre alınacak embriyolarda sakkaroz dozunun, 30 g/l olarak eklenmesi ve her iki ortamında kullanılmasının yerinde olacağını söylemek mümkündür.

9. Sakkarozlu ortamda epikotil ve kök farklılaşması görülen fidecikler, embriyoların kültüre alınmasından 30 gün sonra kültür tüplerinden alınarak, kök budaması yapıldıktan sonra 1 : 1 oranında turba : kum karışımına şaşırtılmalıdır. Üzerleri şeffaf bir kapla kapatılıp 20 - 22 °C sıcaklık, gün ışığı ve % 80 - 90 rutubet içeren kontrollü çevre şartlarında bırakılarak normal gelişimlerinin sürmesi sağlanmalıdır.

Kafkas ihlamurunda bu şekilde; tohum kabuğu ve embriyo dinlenmesinden kaynaklanan ve tohumların tam olgunlaştığı anda toplanması halinde bile, giderilebilmesi için yaklaşık en az 5 aylık bir süreyi gerektiren çimlenme engeli ortadan kaldırılmış olacak ve bu yöntemle, zamana bağlı olmaksızın fidan elde etme imkanı sağlanmış olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Anonim, Ağaçlandırma ve Silvikültür Çalışmaları, T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, O.G.M. Ağaçl. ve Silv. Dairesi, Ankara, 1986.
2. Dinkel, A. M., In Vitro Propagation of Deciduous Trees, For. Res. Inst. Malaysia and Int. Dev. Res. Centre, (1989) 167 - 164.
3. Ürgenç, S., Orman Ağaçları Islahı, İ.Ü. Orman Fak. Yayın No: 293/2836, İstanbul, 1982.
4. Ahuja, M. R., Aspen, Techniques and Applications, Vol 4, Macmillan Publishing Company, New York, 1986, 626 - 651.
5. Ürgenç, S., Ağaçlandırma Tekniği, İ.Ü. Orman Fak. Yayın No: 375/3314, İstanbul, 1986.
6. Gönülşen, N., Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları, T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Ege Tar. Arş. Ens. Müd., Yayın No: 78, İzmir, 1987.
7. Kaya, Z., Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri, Orman Mühendisliği Dergisi, 25, 5 (1988) 12 - 19.
8. Fröhlich, H. J. and Weisberger, H., Research on In Vitro Techniques within the Framework of Poplar Breeding Results and Future Trends, Silvae Genetica, 34, 4 - 5 (1985) 132 - 137.
9. Kleinschmit, J. and Dinkel, A. M., Biotechnology in Forest Tree Improvement: Trees of the Future, Precedings of The NATO Advanced Study Institute, Plenum Publishing Grup, New York, 1989, 1 - 5.
10. Anşin, R. ve Özkan, Z. C., Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) Odunsu Taksonlar, K.T.Ü. Orman Fak. Yayın No: 19/167, K.T.Ü. Basımevi, Trabzon, 1993.
11. Sarıbaş, M., Türkiye'nin Euro - Siberien (Euxine) Bölgesinde Doğal Olarak Yetişen Kavakların Morfolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, K. H. Ğ. O. A. A. E., Teknik Bülten No: 148, 1988.
12. T. M. K. K. Türkiye Milli Kavak Komisyonu Raporu (1984 - 1987), 1987,

13. FAO, Poplars and Willows in Wood Production and Land Use, FAO Forestry Series: 10, Rome, 1979.
14. Anonim, Ulu Önder Atatürk'ün 100. Doğum Yıldönümünde Türkiye'de Kavak ve Kavakçılık, T.C. Tarım Orman ve Köyşleri Bakanlığı, K. H. G. Y. T. O. A. A. E., İzmit, 1981.
15. Sarıbaş, M., Yamaç Arazilerde Kavakçılık, I.Ü. Orman Fak. Dergisi, B 2, 35 (1985) 115 - 120.
16. Tunçtaner, K., Türkiye'de Kavak ve Söğütlere Ait Gen Kaynaklarının Korunması ve Değerlendirilmesi, Orman Bakanlığı, K. H. G. Y. T. O. A. A. E., İzmit, 1993.
17. Kayacık, H., Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği, III. Cilt, I.Ü. Orman Fak. Yayın No: 321/3013, İstanbul, 1982.
18. Ürgenç, S., Ağaç ve Süs Bitkileri Fidanlık ve Yetiştirme Tekniği, I.Ü. Orman Fak. Yayın No: 418/3676, İstanbul, 1982.
19. Gautheret, R. J., Culture Du Tissue Cambial, C. R. Acad. Sci. Paris, 198 (1934) 2195 - 2196.
20. Gautheret, R. J., Nouvelles Recherches Sur Le Bourgeonnement du Tissu Cambial D' Ulmus campestris Cultive In Vitro, C. R. Acad. Sci. Paris, 210 (1940) 744 - 746.
21. Mathes, M. C., The Culture of Isolated Triploid Aspen Tissue, For. Sci., 10 (1964) 35 - 38.
22. Mathes, M. C., The In Vitro Formation of Plantlets from Isolated Triploid Aspen Tissues, Phyton, 21(1964)137 - 141.
23. Chalupa, V., European Hardwoods, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 3, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers , the Netherlands, 1987.
24. Ahuja, M. R., Application of Biotechnology to Forest Tree Species and Problems Involved, Holzwirtschaft, 154 (1986) 187 - 199.
25. Pierik, R. L. M., In Vitro Culture of Higher Plants, Martinus Nijhoff Publishers, the Netherlands, 1987.
26. Ahuja, M. R., Biotechnology in Forest Trees, Plant Research and Development, 33 (1991) 106 - 120.

27. Thorpe, T. A. and Patel, K. R., Clonal Propagation : Adventitious Buds, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 1, Academic Press, New York, 1984,
28. Von Arnold, S., Tissue Culture Methods for Clonal Propagation of Forest Trees, Newsletter, 56 , (1988) 2 - 13.
29. Douglas, G. C., Poplar (*Populus* spp.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y. P. S. Bajaj Ed., Vol 5, Springer - Verlag, Berlin, 1989.
30. Meier - Dinkel, A., Micropropagation of Birches (*Betula* spp.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y. P. S. Bajaj Ed., Volume 18, Springer - Verlag, Berlin, 1992.
31. Ho, R. H., Embryo Culture, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 2, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, 1987.
32. Wolter, K. E., Root and Shoot Initiation in Aspen Callus Cultures, Nature, 219 (1968) 509 - 510.
33. Winton, L. L., Plantlets from Aspen Tissue Cultures, Science, 160 (1968) 1234 - 1235.
34. Winton, L. L., Shoot and Tree Production from Aspen Tissue Cultures, Am. J. of Botany, 57 (1970) 904 - 909.
35. Winton, L. L., Tissue Culture Propagation of European Aspen, For. Sci., 17 (1971) 348 - 350.
36. Venverloo, C. J., The Formation of Adventitious Organs Cytokinin Induced Formation of Leaves and Shoots in Callus Cultures of *Populus nigra* L. *Italica*, Acta Bot. Neerl., 22 (1973) 390 - 398.
37. Chalupa, V., Control of Root and Shoot Formation and Production of Trees from Poplar Callus, Biol., Plant., 16 (1974) 316 - 320.
38. Chalupa, V., Induction of Organogenesis in Forest Tree Cultures, Commun Inst. For. Czech., 9 (1975) 39 - 50.
39. Lester, D. T. and Berbee, J. G., Within - Clone Variation Among Black Poplar Trees Derived from Callus Culture, For. Sci., 23 (1977) 122 - 131.
40. Coleman, G. D. and Ernst, S. G., Shoot Induction Competence and Callus Determination in *Populus deltoides*, Plant Science, 71 (1990), 83 - 92.

- 41.. Huhtinen, O. and Yahyaoğlu, Z., Das fürühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pflänzchen bei der Birke (*Betula pendula* Roth.), Silvae Genetica, 23, 1 - 3 (1974) 32 - 34.
42. Yahyaoğlu, Z., Versuche zur Vegetativen Vermehrung von Fichte (*Picea abies* Karst.) und Birke (*Betula pendula* Roth.) Mit Hilfe der Gewebekulturtechnik, Doktora Tezi, Der Georg August Universität, Göttingen, 1975.
43. Huhtinen, O., Callus and Plantlet Regeneration from Anther Culture of *Betula pendula* Roth., 4 th Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult., Calgary, 1978.
44. Srivastava, P. S. and Steinbauer, A., Regeneration of Birch Plants Catkin Tissue Cultures, Plant Science Letters, 22 (1981) 379 - 386.
45. Simola, L. K., Propagation of Plantlets From Leaf Callus of *Betula pendula* pupurea, Sci. Horticulturae, 26, 1 (1985) 77 - 85.
46. Serivastava, P. S., Steinhauer, A., and Glock, H., Plantlet Differentiation in Leat and Root Cultures of Birch (*Betula pendula* Roth.), Plant Science, 42 (1985) 209 - 214.
47. Saito, A. and Ide, Y., In Vitro Plantlet Regeneration from Adventitious Buds Induced on Cuttings of Peeled Twigs of Japanese White Birch, J. Jpn. For. Soc., 67, 7 (1985) 282 - 284.
48. Chalupa, V., Induction of Organogenesis in Forest Tree Tissue Cultures, Commun. Inst. For. Cech., 9 (1975) 39 - 50.
49. Derevyankin, P. V., Callus Culture of *Ulmus* spp., Le Sovedinie, 4 (1986) 86 - 88.
50. Hu, Q. J. and Han, Y. F., A Study on Induction of Plantlets from Mature Leaves of *Robinia pseudoacacia*, Hereditas, 7, 4 (1985) 20 - 21.
51. Han, K. H., Davis, J. M. and Keathley, D. E., Differential Responses Persist in Shoot Explants Regenerated From Callus of Two Mature Locust Trees, Tree Physiology, 6, 2 (1990) 235 - 240.
52. Zhang, P. F., Ni, D. X., Wang, K. J. and Bao, Z. H., Effects of Plant Hormones on Callus Growth and Organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., Journal of Plantation Crops, 16 (1989) 21 - 26.
53. Kumar, R. R. and Raman, K., Callus Induction and Recovery of Plantlets from Seedling Explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., Journal of Plantation Crops, 16 (1989), 21 - 26.

54. Lee, S. G. and Park, Y. G., Plant Regeneration from Cambium Callus of *Ailanthus altissima* Swingle., J. Kor. For. Soc., 78, 4 (1989) 412 - 418.
55. Brown, C. L. and Sommer, H. E., Vegetative Propagation of Dicotyledonous Trees, Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Second Edition, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, the Netherlands, 1987.
56. Christie, C. B., Rapid Propagation of Aspen and Silver Poplar Using Tissue Culture Techniques, Proc. Int. Plant Propagators Soc., 28 (1978) 225 - 260.
57. Chalupa, V., In Vitro Propagation of Some Broadleaved Forest Trees, Commun. Inst. For. Cech., 11 (1979) 159 - 170.
58. Bagnaresi, U. and Minotta, G., Research on Micropropagation of Poplars of Section Leuce, Annali Accademia Italiana di Science Forestali, 31 (1982) 239 - 254.
59. Ahuja, M. R., Somatic Cell Differentiation and Rapid Clonal Propagation of Aspen, Silvae Genetica, 32, 3 - 4 (1983) 131 - 135.
60. Ahuja, M. R., Short Note : A Commercially Feasible Micropropagation Method for Aspen, Silvae Genetica, 33, 4 - 5 (1984) 174 - 176.
61. Whitehead, H. C. M. and Giles, K. L., Rapid Propagation of Poplars by Tissue Culture Methods, N. Z. J. For. Sci., 7 (1977) 40 - 43.
62. Mehra, P. N. and Cheema, G. S., Clonal Multiplication In Vitro of Himalayan Poplar *Populus ciliata*, Phytomorphology, 30 (1980) 336 - 343.
63. Douglas, G. C., Formation of Adventitious Buds in Stem Internodes of *Populus* hybrid TT32 Cultured In Vitro : Effect of Sucrose, Zeatin, IAA and IBA, J. Plant. Physiol, 121 (1985) 225 - 231.
64. Xu, M. Z., Propagation of Aspen (*Populus davidiana*) Vialled Tissue Culture, Journal of Northeast Forestry University of China, 15, 3 (1987) 24 - 29.
65. Rutledge, C. B. and Douglas, G. C., Culture of Meristem Tips and Micropropagation of Commercial Clones of Poplar In Vitro, Physiologia Plantarum, 72 (1988) 367 - 373.
66. Sellmer, J. C., McCown, B. H. and Haissmg, B. E., Shoot Culture Dynamics of Six *Populus* Clones, Tree Physiology, 5, 2 (1989) 219 - 227.

67. Coleman, G. D. and Ernst, S. G., In Vitro Shoot Regeneration of *Populus deltoides* : Effect of Cytokinin and Genotype, Plant Cell Reports, 8 (1989) 459 - 462.
68. Coleman, G. D. and Ernst, S. G., Axillary Shoot Proliferation and Growth of *Populus deltoides* Shoot Cultures, Plant Cell Reports, 9 (1990) 165 - 167.
69. Chalupa, V., Clonal Propagation of Broad Leaved Forest Trees In Vitro, Commun. Inst. For. Cech., 12 (1981) 255 - 271.
70. Chalupa, V., Micropropagation of Conifer and Broadleaved Forest Trees, Commun. Inst. For. Cech., 13 (1983) 7 - 39.
71. Chalupa, V., In Vitro Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.), Biologia Plantarum, 26, 5 (1984) 374 - 377.
72. Chalupa, V., Effect of Benzylaminopurine and Thidiazuron on In Vitro Shoot Proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L., Biologia Plantarum, 29, 6 (1987), 425 - 429.
73. Youn, Y., Ishii, K., Saito, A. and Ohba, K., In Vitro Plantlet Regeneration from Axillary Buds of Mature Trees of *Tilia cordata*, J. Jpn. For. Soc., 70,7 (1988) 315 - 317.
74. Youn, Y., Ishii, K., Saito, A. and Ohba, K., In Vitro Plantlet Regeneration by Bud Culture and its Multiplication in *Tilia amurensis* Seedlings, J. Jpn. For. Soc., 71, 2 (1989) 61 - 64.
75. Youn, Y. and Ohba, K., In Vitro Plantlet Regeneration from Axillary Buds of *Tilia amurensis* Mature Trees and Clonal Variation in Tissue Culturability, J. Kor. For. Soc., 79, 2 (1990) 109 - 114.
76. Chalupa, V., In Vitro Propagation of *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Fagus* and Other Species Using Adenine - Type Cytokinins and Thidiazuron, Commun. Inst. For. Cech., 14 (1985) 65 - 90.
77. Ide, Y. and Yamamoto, S., In Vitro Plantlet Regeneration from Axillary Buds of Juvenile Seedlings of Kunugi (*Quercus acutissima*), J. Jpn. For. Soc., 68, 11 (1986) 472 - 474.
78. Ide, Y. and Shigehiro, Y., In Vitro Plantlet Regeneration From Axillary Buds of Juvenile Seedlings of Konora (*Quercus serrata*), J. Jpn. For. Soc., 69, 3 (1987) 109 - 112.
79. Meier - Dinkel, A., In Vitro Propagation and Establishment of *Quercus robur* and *Quercus petraea*, Allgemeine Forst und Jagdzeitung, 158, 11 - 12 (1987) 199 - 204.

80. Volkaert, H., Schoofs, J., Reters, A. and Delanghe, E., Influence of Explant Source on In Vitro Axillary Shoot Formation in Oak Seedlings, Tree Physiology, 6 (1990) 87 - 93.
81. San - Jose, M. C., Vieitez, A. M. and Ballester, A., Clonal Propagation of Juvenile and Adult Trees of Sessile Oak by Tissue Culture Techniques, Silvae Genetica, 39, 2 (1990) 50 - 55.
82. Sengi, Y., In Vitro Plantlet Regeneration From Axillary Buds of An Adult Mizunara (*Quercus crispula* Blume.), J. Jpn. For. Soc., 72, 2 (1990) 143 - 146.
83. Manzanera, J. A. and Pardos, J. A., Micropropagation of Juvenile and Adult *Quercus suber* L., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21, 1 (1990) 1 - 8.
84. Johnson, K. R. and Walker, R. F., Micropropagation of Valley Oak Shoots from Seedling Explants, New Forests, 4, 4 (1991) 271 - 279.
85. Ballester, A. and Meier - Dinkel, A., Micropropagation of *Quercus* species, Woody Plant Working Group Commission of European Communities, 1992, 41 - 75.
86. Dorion, N., Danthu, P. and Bigot, C., Multiplication Vegetative In Vitro de Quelques Especies D' Ormes, Ann. Sci. For., 4, 1 (1983) 103 - 118.
87. Mezzetti, B., Minotta, G., Navacchi, O. and Rosati, P., In Vitro Propagation of *Ulmus carpinifolia*, Acta Horticulturae, 227 (1988) 396 - 398.
88. Biondi, S., Cancianini, L., De Paoli, G. and Bagni, N., Shoot Formation Bud Cultures of Mature Chestnut, In Colloq. Intern. Sur La Culture In Vitro des Essences Forestiers, IUFRO , 1981, Fontainebleau - France, 181 - 185.
89. Vieitez, A. M. and Vieitez, M. L., *Castanea sativa* Plantlets Proliferated From Axillary Buds Cultivated " In Vitro ", Scientia Horticulturae, 18 (1982) 343 - 351.
90. Vieitez, A. M., Ballester, A., Vieitez, M. L. and Vieitez, E., In Vitro Plantlet Regeneration of Mature Chesnut, Journal of Hort. Sci., 58, 4 (1983) 457 - 463.
91. Ballaster, A., Sanchez, M. C., Vieitez, A. M., Etiolation as a Pretreatment for In Vitro Establishment and Multiplicatiin of Mature Chesnut, Physiologia Plantarum, 77 (1989) 395 - 400.

92. Sanchez, M. C. and Vieitez, A. M., In Vitro Morphogenetic Competence of Basal Sprouts and Crown Branches of Mature Chestnut, Tree Physiology, 8 (1991) 59 - 71.
93. Perinet, P. and Tremblay, F. M., Commercial Micropropagation of Five Alnus Species, New Forests, 1, 3 (1987) 225 - 230.
94. Barghichi, M., Micropropagation of Alnus cordata (Loisel.) Loisel., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 15 (1990) 233 - 244.
95. Ahuja, M. R., Short Note : In Vitro Induction of Organogenesis in Juvenile and Mature Beech, Silvae Genetica, 33, 6 (1984) 241 - 242.
96. Gebhardt, K. and Weisberger, H., Viability and In Vitro Growth of Shoot Tips from Adult Beech, Poster Presentation at the VII th. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, June 24 - 29, Amsterdam, 1990.
97. Minocha, S. C., Noh, E. W. and Kaush, A. P., Tissue Culture and Genetic Transformation in Betula papyrifera and Populus tremuloides, TAPPI, Research and Development Conf. Technology Park, 1986, Atlanta, 89 - 92.
98. Sato, T., Ide, Y. and Saito, A., Tissue Culture Technology in The Rapid Clonal Propagation of Japanese White Birch, J. Jpn. For. Soc., 8, 68 (1986) 343 -346.
99. Ide, Y., In Vitro Clonal Propagation of Mature Japanese Cherry Birch, J. Jpn. For. Soc., 69, 4 (1987) 161 - 163.
100. Struve, D. K. and Lineberger, R. D. Restoration of High Adventitious Root Regeneration Potential in Mature Betula papyrifera Marsh. Softwood Stem Cuttings, Can. J. For. Res., 18 (1988) 265 - 269.
101. Perez, C. and Postigo, P. Micropropagation of Betula celtibrata, Annals of Botany, 64, 1 (1989) 67 - 69.
102. Ide, Y. and Yamamoto, S., In Vitro Plantlet Regeneration of Mature Monarch Birch (Betula maximowicziana) by Winter Bud Culture, J. Jpn. For. Soc., 72, 2 (1990) 147-150.
103. Vijayakumar, N. K., Feret, P. P. and Sharik, T. L., In Vitro propagation of the Endangered Virginia Roundleaf Birch (Betula uber (Ashe) Fern.) Using Dormant Buds, Forest Science, 36, 3 (1990) 842 - 846.
104. Chalupa, V., In Vitro Propagation of Willows (Salix spp.), European Mountain Ash (Sorbus aucuparia L.) and Black Locust (Robinia pseudocacia L.), Biologia Plantarum, 25, 4 (1983) 305 - 307.

105. Barghchi, M., Nass Clonal Propagation In Vitro of Robinia pseudoacacia L. (Black Locust) cv. ' Jaskiseri ', Plant Science, 53 (1987) 183 - 189.
106. Keresztesi, B., The Black locust, B. Keresztesi Editor, Akademiai Kiado, Budapest, 1988.
107. Davis, J. M., Responses of Different Genotypes of Robinia pseudoacacia L. to Micropropagation and Agrobacterium Mediated Transformation, Doktora Tezi, Michigan State University, 1989.
108. Ohyama, K. and Oka, S., Regeneration of Whole Plants from Isolated Shoot Tips of Mulberry Tree, J. Seric. Sci. Soc. Jpn. 45 (1976) 115 - 120.
109. Ohyama, K. and Oka, S., Mulberry, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 3, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, 1987.
110. Sharma; K. K. and Thorpe, T. A., In Vitro of Mulberry (Morus alba L.) Through Nodal Segments, Scientia Horticulturae, 42 (1990) 307 - 320.
111. Yadav, U., Lal, M. and Jaiswal, V. S., Micropropagation of Morus nigra L. from Shoot Tip and Nodal Explants of Mature Trees, Scientia Horticulturae, 44, 1 - 2 (1990) 61 - 67.
112. Riffaud, J. L. and Cornu, D., Utilisation de la Culture In Vitro Pour la Multiplication de Merisiers Adultes (Prunus avium L.) Selectonnes en Foret, Argonomie, 1 (1981) 633 - 640.
113. Cornu, D. and Chaix, C., Multiplication par Culture In Vitro de Merisiers Adultes (Prunus avium L.) : Application a Un Large Evential de Clones, In proc IUFRO Sect S2 015. Int. Workshop " In Vitro " Cultivation For Tree Species, 1981, Fontainebleau, 71 - 79.
114. Meier - Dinkel, A., In Vitro Vermehrung Ausgewahlter Genotypen der Vogelkirsche (Prunus avium L.), Allg. Forst. U. Jagd. Ztg., 157, 7 (1986) 139 - 144.
115. Curir, P., Damiano, C., Esposito, P. and Ruffpni, B., The In Vitro Propagation of Eucalyptus gunii Hook. and Eucalyptus stuartiana F. V. M., Annali Dell' Istituto. Sperimentale per la Floricoltura, 17, 1 (1986) 73 - 84.
116. Sita, G. L., Sohba, R. and Rao, K. S., Propagation of Eucalyptus grandis by Tissue Culture, Kerala Forest Research Institute, (1986) 318 - 321.

117. Kumar, R. R. and Ayyappan, P., Rapid Clonal Multiplication of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Through In Vitro Culture, Planters Chronicle, 81, 7 (1987) 225 - 227.
118. Rao, K. S., In Vitro Meristem Cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm., Plant Cell Reports, 7 (1988) 546 - 549.
119. Warrag, E. I., Direct and Indirect Tissue Culture Micropropagation and Greenhouse Plantlet Evaluation of Superior *Eucalyptus grandis* Hybrids, Doktora Tezi, University of Florida, Florida, 1989.
120. Warrag, E. I. Lesney, M. S. and Rockwood, D. L., Micropropagation of Field Tested Superior *Eucalyptus grandis* hybrids, New Forests, 4, 2 (1990) 67 - 79.
121. Trindade, H., Ferreira, J. G., Pais, M. S. and Aloni, R., The Role of Cytokinin and Auxin in Rapid Multiplication of Shoots of *Eucalyptus globulus* Grown In Vitro, Australian Forestry, 53, 4 (1990) 221 - 223.
122. Van - Staden, J. and Le - Roux, J. J., Micropropagation of *Eucalyptus* Species, Hort Science, 26, 2 (1991), 199 - 200.
123. Cheng, T. Y., Clonal Propagation of Woody Plant Species Through Tissue Culture Techniques, Proc. Int. Plant. Propagators Soc., 28, (1978) 139 - 155.
124. Steffan, S. J. and Millikan, D. F., Micropropagation of Black Walnut Trees, Annu. Rept. North Nut Growers. Assoc., 74 (1983) 26 - 29.
125. Kai, H. A., Salesses, G. and Mouras, A., Multiplication In Vitro du Noisetier (*Corylus avellana* L.), Argonomie, 4, 4 (1984), 399 - 402.
126. Sutter, E., and Barker, P., Tissue Culture Propagation of Selected Mature Clones of *Liquidambar styraciflua* L., Plant Propagators Soc. Comb. Proc., 33 (1984) 113 - 117.
127. Burger, D. W., Liu, L. and Wu, L., Rapid Micropropagation of *Paulownia tomentosa*, Hort Science, 4 (1985) 760 - 761.
128. Preece, J. E., Christ, P. H., Ensenberger, L. and Zhao, J. L., Micropropagation of Ash (*Fraxinus*), Plant propagators Soc. Comb. Proc., 37 (1988) 366 - 372.
129. Economou, A. S. and Spanoudaki, M. J., Regeneration In Vitro of Oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) from Shoot Tips of Mature Trees, Acta Horticulturae, 227 (1988) 363 - 368.

130. Song, S. L., Sato, T., Ishii, K., Saito, A. and Ohba, K., In Vitro Mass Propagation by Meristem Culture of Two Mature Trees of *Paulownia catalpifolia*, J. Jpn. For. Soc., 72, 6 (1990) 495 - 498.
131. Garton, S., In Vitro Propagation of *Salix* spp. and The Effects of Nitrogen, Phosphorus and Potassium on Growth, Propagability, and Foliar Nutrient Composition of *Salix* Stock Plants, Doktora Tezi, University of Minnesota, Minnesota, 1990.
132. Yunnita, S., Geneve, R. L. and Kester, S. T., Micropropagation of White Flowering Eastern Redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.), Journal of Environmental Horticulture, 8, 4 (1990) 177 - 179.
133. Masubuchi, M., In Vitro Plantlet Regeneration from Multiple Shoots of Red Horse Chesnut (*Aesculus x carnea* Hayne) by Shoot Tip Culture, J. Jpn For. Soc., 73, 4 (1991) 293 - 297.
134. Boulay, M., Multiplication et Clonage Rapide du *Sequoia sempervirens* par La Culture In Vitro, Etude et Recherches, 12 (1979) 49 - 55.
135. Kathryn, R. and Washer, J., Vegetative Propagation of Radiata Pine by Tissue Culture: Plantlet Formation from Embryonic Tissue, N. Z. J. For. Sci., 7, 2 (1977) 199 - 206.
136. Mott, R. L. and Ameson, H. V., Tissue Culture Plantlets Produced from *Pinus monticola* Embryonic Materials, Forest Sci., 27, 2 (1981) 299 - 304.
137. Von Arnold, S., Factors Influencing Formation, Development and Rooting of Adventitious Shoots from Embryos of *Picea abies* (L.) Karst., Plant Science Letters, 27 (1982) 275 - 287.
138. Pletikapić, B. K., Jelaska, S. and Berliak, J., Bud and Shoot Formation in Juvenile Tissue Culture of *Pinus nigra*, Silvae Genetica, 32, 3 - 4 (1983) 115 - 118.
139. Rumary, C. and Thorpe, T. A. Plantlet Formation in Black and White Spruce. I. In Vitro Techniques, Can. J. For. Res., 14 (1984) 10 - 16.
140. Patel, K. R. and Thorpe, T. A., In Vitro Regeneration of Plantlets From Embryonic and Seedling Explant of Engelmann Spruce (*Picea engelmannii* Parry.), Tree Physiology, 3 (1987) 273 - 283.
141. Harry, I. S., Thompson, M. R., Lu, C. Y. and Thorpe, T. A. In Vitro Plantlet Formation from Embryonic Explants of Eastern White Cedar (*Thuja occidentalis* L.), Tree Physiology, 3 (1987) 273 - 283.

142. Pulido, C. M., Harry, I. S. and Thorpe, T. A., In Vitro Regeneration of Plantlets of Canary Island Pine (*Pinus canariensis*), Can. J. For. Res. 20 (1990) 1200 -1211.
143. Webb, D. T., Flinn, B. S. and Georgis, W., Micropropagation of Eastern White Pine (*Pinus strobus* L.), Can. J. For. Res., 18 (1988) 1570 - 1580.
144. Chang, S., Sen, S., Mc Kinley, C. R. and Newton, R. J., Clonal Propagation of Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.) by Organogenesis, Plant Cell Reports, 10 (1991) 131 - 134.
145. Bulard, C. and Monin, J., Etude de Compartement d' Embryons de *Fraxinus excelsior* L. Prevelens Dans des Graines Dormantes et Cultives In Vitro, Phyton, 20 (1963) 115 - 125.
146. Yüce, B., Zeytin Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Çalışmalar, Tarım Araştırma Dergisi, 1 (1979) 189 - 203.
147. Vieitez, A. M. and Vieitez, E., Plantlet Formation From Embryonic Tissue of Chestnut Grown In Vitro, Physiol. Plant., 50 (1980) 127 - 130.
148. Vieitez, M. and Vieitez, E., Culture of Chestnut Shoots Buds In Vitro, J. Hort. Sci., 55 (1980) 83 - 84.
149. Bellarosa, R., In Vitro Culture of *Quercus suber* L. Embryos, In Proc. IUFRO Sect. S2 01 5 Internat Sur la Culture " In Vitro " des Essences Forestieres, 1981, 119 - 125.
150. Deidda, P., Azzena, M. and Coinu, G., In Vitro Plantlet Regeneration From *Quercus suber* L. Seedlings, Acta Horticulturae, 227 (1988) 393 - 395.
151. Srivastava, P. S. and Steinhauer, A., In Vitro Culture of Embryo Segments of *Quercus lebanus* : Organogenesis and Callus Growth as a Differential Response to Experimental Conditions, Z. Pflanzenphysiol., 106 (1982) 93 - 96.
152. Sommers, P. W., Sambeck, J. W., Preece J. E., Gaffney, G. and Myers, O., In Vitro Micropropagation of Black Walnut (*Juglans regia* L.), Proc. 7 th. North. Am. For. Biol. Workshop, 1982, 224 - 230.
153. Caroso, J. L., In Vitro Axillary Shoot Formation and Rooting in Black Walnut Mature Embryos, Proc. 3 rd. North Central Tree Improv. Conf., 1983, 144 - 149.
154. Jay - Alleman C. and Cornu, D., Culture In Vitro d' Embryons Isoles de Noyer Commun (*Juglans regia* L.), Ann. Sci. For., 43, 2 (1986) 189 - 198.

155. Cossio, F. and Minolta, G., preliminary Trials on The In Vitro Culture of Embryos Isolated from Walnuts, and Comparison on Different Mineral Salt Combinations, Rivista Della Ortotroflutticol, 67 (1983), 287 - 298.
156. Kim, J. H., Moon, H., Park, J. and Lee, B., Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Callus From Hypocotil Segments of *Tilia amurensis*, Genetic Manipulation of Woody Plants, 1988, New York, 473 - 474.
157. Merkle, S. A. and Wiecko, A. T., Regeneration of *Robinia pseudoacacia* Via Somatic Embryogenesis, Can. J. For. Res., 19 (1989) 285 - 288.
158. Mekle, S. A. and Wiecko, A. T., Somatic Embryogenesis in Three *Magnolia* Species, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 115, 5 (1990) 858 - 860.
159. Chalupa, V., Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Cultured Immature Embryos of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.), Plant Cell Reports, 9 (1990) 398 - 401.
160. Küçük, M., Maçka - Meryamana ve Altindere Vadisi Milli Parkının Önemli Ağaç Türleri Üzerine Fenolojik Gözlemler ve Sonuçları, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Raporlar Serisi No : 47, Ankara, 1991.
161. Mccown, B. H. and Sellmer, J. C., General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 1, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers, the Netherlands, 1987.
162. Murashige, T. and Skoog, F. A., A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15 (1962) 473 - 497.
163. Llyod, G. and McCown, B., Commercially - Feasible Micropropagation of Mountain Laurel *Kalmia latifolia*, By Use of Shoot - Tip Culture, Comb. Proc. Intern. Plant. Prop. Soc., 30 (1981) 421 - 427.
164. Thompson, M. R. and Thorpe, T. A., Metabolic and Non - Metabolic Roles of Carbohydrates, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don j. Durzan Editors, Volume 1, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers the Netherlands, 1987.
165. Thorpe, T. A., Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture, Academic Press., New York, 1981.
166. Wareing, P. E. and Philips, I. D. J., The Control of Growth and Differentiation in Plants, Pergamon Press., 1973.

167. Minocha, S. C., Plant Growth Regulators and Morphogenesis Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 1, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers the Netherlands, 1987.
168. Biondi, S. and Thorpe, T. A., Requirements For A Tissue Culture Facility, Plant Tissue Culture : Methods and Applications in Agriculture, T.A. Thorpe Editor, First Edition, Academic Press, New York, 1981.
169. Vieitez, A. M., Vieitez, M. L. and Vieitez, E., Chestnut (*Castanea* spp.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 1 : Trees I, Y. P. S. Bajaj Editor, Berlin, 1986.
170. Bonga, J. M., Tissue Culture Techniques, Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Second Edition, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, the Netherlands , 1985.
171. Bhojwani, S. S. and Radzan, M. K., Plant Tissue Culture, Theory and Practice, Elsevier Science Publishing Co., 1983.
172. Chalupa, V., Temperature, Cell and Tissue Culture in Forestry, J. M. Bonga and Don J. Durzan Editors, Volume 1, First Edition, Martinus Nijhoff Publishers, the Netherlands, 1987.
173. Kalıpsız, A., İstatistik Yöntemler, İ. Ü. Orman Fakültesi Yayın No : 394/3522, 2. Baskı, Doyuran Matbaası, İstanbul, 1988.

7. ÖZGEÇMİŞ

19 Mart 1963 tarihinde Giresun İlimizin Alucra İlçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şebinkarahisar'da tamamladı. 1981 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümünden "İyi" derece ile mezun oldu ve "Orman Mühendisi" ünvanını aldı. 1985 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 20 Ağustos 1986 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü Silvikültür Anabilim Dalı'nda "Araştırma Görevlisi" ünvanıyla göreve başladı. Yüksek lisans öğrenimini 1988 yılında tamamladı ve "Orman Yüksek Mühendisi" ünvanını aldı. 1988 yılı Şubat ayında aynı Enstitünün Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora programına kaydoldu. Ağustos 1988 - Kasım 1989 tarihleri arasında askerlik hizmetini yedek subay olarak tamamladıktan sonra, doktora öğrenimine devam etti. Halen Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

Bekar olan Ali Ömer ÜÇLER İngilizce bilmektedir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMAN İZLEN MERKEZİ