



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**“GEMLİK” VE “DOMAT” ZEYTİN
(OLEA EUROPAEA L.) ÇEŞİTLERİNİN
IN VITRO KOŞULLARDA REJENERASYON
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Meltem BAYRAKTAR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 11.02.2013

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**“GEMLİK” VE “DOMAT” ZEYTİN
(*OLEA EUROPAEA* L.) ÇEŞİTLERİNİN *IN VITRO*
KOŞULLARDA REJENERASYON
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Meltem BAYRAKTAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi: 11.02.2013

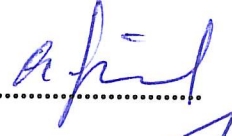
**Bornova-İZMİR
2013**

Meltem BAYRAKTAR tarafından doktora tezi olarak sunulan ""Gemlik" ve "Domat" Zeytin (*Olea europaea* L.) Çeşitlerinin *In Vitro* Koşullarda Rejenerasyon Potansiyellerinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11.02.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

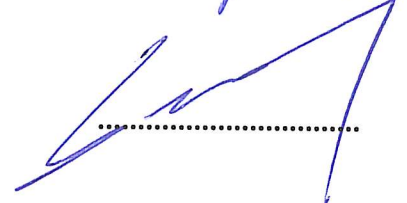
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

.....


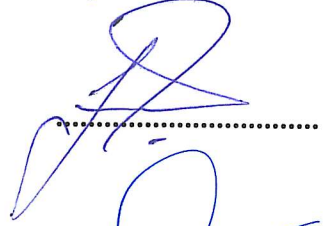
Raportör Üye : Prof. Dr. Ercan ÖZZAMBAK

.....


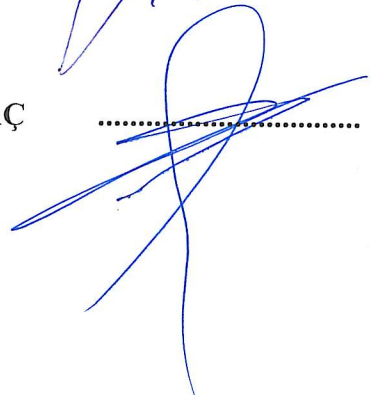
Üye : Doç. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

.....


Üye : Prof. Dr. Betül BÜRÜN

.....


Üye : Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

.....


ÖZET

“GEMLİK” VE “DOMAT” ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA* L.) ÇEŞİTLERİNİN *IN VITRO* KOŞULLARDA REJENERASYON POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

BAYRAKTAR, Meltem

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Şubat 2013, 193 sayfa

Bu çalışma kapsamında, köklenmesi kolay olan (Gemlik) ve köklenmesi zor olan (Domat) iki zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidinin *in vitro* koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren farklı besin ortamlarında sürgün ve kallus rejenerasyon tepkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gemlik çeşidinin seradaki fidanlarına ait nod eksplantlarında yapılan sterilizasyon uygulamalarında, bahçede yetiştirilen ağaçların nod eksplantlarına göre daha iyi sterilizasyon yüzdeleri elde edilmiştir (ağaç nod eksplantları: %93.3 ve fidan nod eksplantları: %97.3). Fidanlara ait nod eksplantların çoğunluğunun (%82.7) uygulanan sterilizasyon yöntemlerinden sonra kararmadıkları saptanmıştır. Test edilen beş temel besin ortamı (OM_b, WPM, DKW, OM_s ve modifiye OM_s) arasında WPM besin ortamının seradaki Gemlik fidanlarına ait tek nodlu eksplantlardan sürgün rejenerasyonu için en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Gemlik çeşidinde maksimum sürgün rejenerasyon yüzdesi (%93.3) ve eksplant başına maksimum sürgün sayısı (1.87 adet) 4 mg/l BA içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. 0.5 mg/l BA içeren WPM besin ortamında en düşük vitrifikasyon yüzdesi %70.6 olarak bulunmuştur. *In vitro* koşullarda Gemlik sürgünlerinin uzama-çoğaltma aşaması için OM_s ortamı 5mg/l KNO₃ ve 2 mg/l ZEA ile zenginleştirilmiştir.

Domat çeşidinde nod eksplantları geçici daldırma sistemine dayalı RITA® biyoreaktöründe kültüre alındıklarında, en düşük kararma oranı %60, en yüksek sürgün rejenerasyonu %60 ve eksplant başına sürgün sayısı 1.09 adet olarak belirlenmiştir. 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BA içeren OM_b besin ortamında petiol eksplantlarından karanlık koşullarda %80 oranında kallus oluşumları elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Olea europaea* L., zeytin, rejenerasyon, sürgün, kararma, vitrifikasyon, kallus, geçici daldırma sistemi, RITA® biyoreaktörü

ABSTRACT**DETERMINATION OF REGENERATION POTENTIALS OF
“GEMLİK” AND “DOMAT” OLIVE (*OLEA EUROPAEA* L.)
VARIETIES *IN VITRO* CONDITIONS**

BAYRAKTAR, Meltem

Ph.D. in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

February 2013, 193pages

In this study, it is aimed determination of the regeneration responds of two olive varieties, easy-to-root cultivar (Gemlik) and difficult-to-root cultivar (Domat), in different media involving various plant growth regulators *in vitro* conditions.

In sterilization applications were made in node explants belonging to greenhouse-grown plants of Gemlik variety were obtained better sterilization percentages (tree node explants: 93.3% and sapling node explants: 97.3%) than node explants of field-grown trees. It is determined that many of node explants (82.7%) belonging to saplings did not brown after sterilization methods applied. Among five basal media (OM_b, WPM, DKW, OM_s and modified OM_s) tested, WPM medium was determined to be most suitable for shoot regeneration from single node explants of greenhouse-grown Gemlik saplings. Maximum percentage of shoot regeneration (93.33%) and maximum number of shoots per explant (1.87) in Gemlik variety were obtained from WPM medium supplemented with 4 mg/l BA. The lowest percentage of vitrification was found as 70.6% in WPM medium containing 0.5 mg/l BA. For the elongation-proliferation stage of Gemlik shoots *in vitro* conditions, OM_s was enriched with 5mg/l KNO₃ and 2 mg/l ZEA.

In Domat variety, when node explants were cultured in RITA[®] bioreactor based on temporary immersion system, the lowest browning percentage, the highest shoot regeneration and the highest number of shoots per explant were determined with respectively 60%, 60% and 1.09. Callus formation was obtained from petiole explants cultured on OM_b medium containing 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BA in continuous darkness.

Keywords: *Olea europaea* L., olive, regeneration, shoot, browning, callus, temporary immersion system, RITA[®] bioreactor

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü destek ve yardım sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Aynur Gürel'e, fidan temininde ve zeytin hakkında bilgi konusunda yardımlarını esirgemeyen Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan Dr. Nuran Varol'a, zeytin fidanlarının bakımında bana yardımcı olan ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarıma ve beni her konuda destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması; Ege Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü (09-MUH-010) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	5
2.1 Bitkisel Özellikler	5
2.2 Zeytinde Çoğaltım Teknikleri.....	6
2.3 Zeytinin Doku Kültürü İle Üretimi	7
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1 Ocak-Haziran 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	26
3.1.1 Materyal.....	26
3.1.2 Metot.....	27
3.2 Temmuz-Aralık 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	31
3.2.1 Materyal.....	31
3.2.2 Metot.....	32

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3 Ocak-Haziran 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	36
3.3.1 Materyal.....	36
3.3.2 Metot.....	36
3.4 Temmuz-Aralık 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	37
3.4.1 Materyal.....	37
3.4.2 Metot.....	37
3.5 Ocak-Haziran 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	41
3.5.1 Materyal.....	41
3.5.2 Metot.....	42
3.6 Temmuz-Aralık 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	45
3.6.1 Materyal.....	45
3.6.2 Metot.....	45
3.7 Ocak-Haziran 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	48
3.7.1 Materyal.....	48
3.7.2 Metot.....	48
3.8 Temmuz-Aralık 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	53
3.8.1 Materyal.....	53

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
3.8.2 Metot.....	53
3.9 Verilerin Değerlendirilmesi.....	61
4. BULGULAR.....	63
4.1 Ocak-Haziran 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	63
4.1.1 Seradaki Gemlik fidanlarından kurulan nod kültürlerinden elde edilen sonuçlar	63
4.1.2 Seradaki Domat fidanlarından kurulan nod kültürlerinden elde edilen sonuçlar	73
4.2 Temmuz-Aralık 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	75
4.2.1 Sürgün Geliştirme Ortamının Belirlenmesi İle İlgili Uygulamalar	75
4.2.2 Seradaki fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar	76
4.2.3 Bahçedeki ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar	88
4.3 Ocak-Haziran 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	92
4.4 Temmuz-Aralık 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	97
4.4.1 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar	97

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.2 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar	99
4.5 Ocak-Haziran 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	101
4.5.1 Nod kültürü denemeleri	101
4.5.2 Meristem kültürü denemesinden elde edilen sonuçlar.....	105
4.6 Temmuz-Aralık 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	105
4.6.1 Nod kültürü denemeleri	105
4.6.2 Meristem kültürü	117
4.6.3 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlar	118
4.6.4 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi	123
4.7 Ocak-Haziran 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	124
4.7.1 Nod kültürü denemeleri	124
4.7.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar	125
4.7.3 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi	130
4.7.4 Meristem kültürü denemeleri.....	130

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.8 Temmuz-Aralık 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	132
4.8.1 Nod kültürü denemeleri	132
4.8.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar	141
4.8.3 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi	150
4.8.4 Meristem kültürü denemeleri	150
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	152
6. ÖNERİLER	172
KAYNAKLAR DİZİNİ	181
ÖZGEÇMİŞ	193

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 2009 yılı Nisan-Mayıs aylarında kurulan denemeler için kullanılan ve Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait seralarda bulunan fidanların görünümü	26
3.2 Eksplant olarak kullanılan tek yıllık (a) Domat çeşidi sürgünleri (b) Gemlik çeşidi sürgünleri	27
3.3 Eksplantların sterilizasyonu ve kültüre alınması	28
3.4 Zeytin güvesinin fidanlarda yol açtığı zararlar	39
3.5 Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan temin edilen ve Biyomühendislik Bölümü'ne ait serada muhafaza edilen yeni fidanlar	41
3.6 Meristemin stereo mikroskop altında izolasyonu ve kültüre alınması (bar=1 cm)	44
3.7 Zeatinin filtre sterilizasyonu ile besin ortamına eklenmesi	52
3.8 Zeytin güvesi ve bitkide oluşturduğu zarar.....	53
3.9 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan zeytinyağı uygulaması	57
3.10 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda kullanılan tek, iki ve üç nodlu eksplantlar (bar=1 cm)	57
3.11 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda kullanılan RITA bitoreaktörlerinde kültürlerin kurulması	58
3.12 Meristemlerin izolasyonu ve nörs doku üzerinde kültüre alınması (bar=1 cm)	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren Omb ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) 67
4.2	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren Omb ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) 68
4.3	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren Omb ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (adet) 70
4.4	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren Omb ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının oluşturdıkları eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet)..... 71
4.5	Gemlik çeşidinde Ocak-Haziran 2009 döneminde zeatinli ortamlarda kültüre alınan nodal eksplantlardan gelişen sürgünler..... 72
4.6	Gemlik çeşidinde Ocak-Haziran 2009 döneminde kültüre alınan nodal eksplantlardan (a) Omb ortamında gelişen ve bazal kısmında kallus oluşturmayan (b) 2 mg/l KİN (c) 2 mg/l BA (d) ve (e) 2 mg/l zeatin içeren Omb ortamlarında gelişen ve bazal kısımlarında kallus oluşturan sürgünler 73
4.7	Gemlik ve Domat çeşitlerinde gözlenen (a) açık yeşil yapraklı sürgün (b) yaprak nekrozisi (c) yaprak ana damarlarının koyu yeşil diğer kısımların açık yeşil olduğu sürgünler (d) yaprak absisyonu 76
4.8	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) 80

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)..... 80
4.10	Gemlik fidanlarından alınan eksplantlardan rejenere olan sürgünler (bar=1cm) 81
4.11	Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) 87
4.12	Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) 87
4.13	Domat fidanlarından alınan eksplantlardan rejenere olan sürgünler (bar=1cm)..... 88
4.14	Gemlik çeşidinde bağlı bulundukları ana dokudan kesilmeyerek kültüre alınan in vitro sürgünlerin potasyumu arttırılmış modifiye OMs ortamında (3. Ortam) gelişimi (bar=1cm)..... 93
4.15	Domat çeşidinde bağlı bulundukları ana dokudan kesilmeyerek kültüre alınan in vitro sürgünlerin potasyumu arttırılmış modifiye OMs ortamında (3. Ortam) gelişimi (bar=1cm)..... 93
4.16	Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm) 94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Potasyumu artırılmış 3 no'lu ortamda kültüre alınan Gemlik sürgünlerinde gözlenen (a) klorozis (b) yaprak kıvrılmaları (bar=1 cm)	96
4.18 Yarı katı OMb ortamında kültüre alınan meristemde gözlenen kararma	105
4.19 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)	107
4.20 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)	107
4.21 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayısı (adet)	108
4.22 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nodeksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet).....	109
4.23 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)	110
4.24 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)	111
4.25 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm).....	111
4.26 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%).....	112

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.27 Gemlik çeşidinde ZEA içeren besin ortamlarında nodal eksplantlardan rejenere olan (a) normal sürgünler (b) vitrifikasyon gösteren sürgünler (c) kallus oluşturan eksplantlar (bar=1cm)	113
4.28 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)114	
4.29 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)	115
4.30 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	116
4.31 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet).....	116
4.32 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarında gözlenen kararma yüzdesi (%)	117
4.33 Sıvı ortamda kültüre alınan meristemlerde kararma.....	118
4.34 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%).....	120
4.35 Domat çeşidinde 4 mg/l ZEA içeren WPM besin ortamında kararan eksplantın bazal kısmında gelişen yeşil kallus oluşumu	123
4.36 Domat çeşidinde kültürden 30 gün sonra 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OMb ortamında (a) internodyum (b) petiol eksplantlarında gözlenen kallus oluşumları.....	124
4.37 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3., ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%).....	127

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.38 Domat çeşidinde (a) aydınlık koşullarda elde edilen yeşil renkli kalluslar (b) karanlık koşullarda elde edilen krem renkli kalluslar	131
4.39 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm).....	135
4.40 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)	137
4.41 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm)	138
4.42 Gemlik çeşidinde BA, KİN, GA3 içeren besin ortamlarında vitrifikasyon gözlenen sürgünler	140
4.43 Gemlik çeşidinde BA, KİN içeren besin ortamlarında gelişen sürgünlerde meydana gelen morfolojik farklılıklar (bar=1 cm)	140
4.44 Domat çeşidinde kararın probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait karar yüzdeleri (%)	143
4.45 Domat çeşidinde kararın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)	146
4.46 Domat çeşidinde kararın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%).....	147
4.47 Domat çeşidinde kararın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	147

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.48 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	148
4.49 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda (a) 8. uygulamadan (b) 5. ve 6. uygulamalardan elde edilen sürgünler (bar=1 cm).....	149
4.50 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda RITA biyoreaktörlerinde sıvı kültürlerde sürgün rejenerasyonu (bar=1 cm)	150
4.51 Domat çeşidinde 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP içeren OMB ortamında altkültürü yapılan kalluslar	151
4.52 Nörs doku olarak kullanılan (a) pamuk kallusu (b) mısır kallusu (c) tütün kallusu üzerinde kültüre alınan ve kararan zeytin meristemleri	151

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Tüm çalışmalar süresince kullanılan temel besin ortamları.....	30
3.2 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları.....	31
3.3 Sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri	33
3.4 Bahçedeki ağaçlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	36
3.5 Bahçedeki ağaçlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlar için uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	40
3.6 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan temel besin ortamları.....	42
3.7 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları.....	46
3.8 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları.....	52
3.9 Seradaki Gemlik çeşidine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları.....	54
4.1 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMb ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra steril eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	64

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.2	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMB ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında steril eksplant yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları 65
4.3	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMB ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%) 66
4.4	Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMB ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının kültüre alındıktan 30 gün sonra oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (adet) ve eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet) 69
4.5	Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMB ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra steril eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%) 74
4.6	Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OMB ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında steril eksplant yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları 75
4.7	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%) 77
4.8	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları 77
4.9	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%)..... 78

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları 78
4.11	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%) 79
4.12	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları 79
4.13	Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda Omb besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) 80
4.14	Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) 82
4.15	Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri (%)..... 82
4.16	Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları 83

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'luk NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre 30 gün sonunda elde edilen steril eksplant yüzdeleri (%)	84
4.18 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'luk NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre 30 gün sonunda elde edilen steril eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları	84
4.19 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'luk NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre elde edilen steril eksplant yüzdeleri ile ilgili LSD gruplandırması	85
4.20 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OMb besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	86
4.21 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OMb besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	86
4.22 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OMb besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.23	Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%) 89
4.24	Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları 90
4.25	Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%) 91
4.26	Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları 91
4.27	Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış ve ana dokudan ayrılmamış in vitro sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm)..... 94
4.28	Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet), yapraklarda nekroz ve kloroz gözlenen sürgün sayısı * (adet)..... 95
4.29	Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları 95
4.30	Domat çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm) 96

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.31 Domat çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgünlerin 3. besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet), yapraklarda nekroz ve kloroz gözlenen sürgün sayısı (adet).....	97
4.32 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)	98
4.33 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	99
4.34 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)	100
4.35 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	100
4.36 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	102
4.37 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	102
4.38 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%).....	103
4.39 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	103

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.40 Domat çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri (%).....	104
4.41 Domat çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları	104
4.42 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nodeksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	106
4.43 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	108
4.44 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)	109
4.45 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet) ve ortalama yaprak uzunluğu (cm)	110
4.46 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)	112
4.47 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%)	114
4.48 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	115

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.49 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarında gözlenen kararma yüzdesi (%)	117
4.50 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%).....	119
4.51 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	121
4.52 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili LSD gruplandırması	122
4.53 Domat çeşidinde 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OMB ortamında kültüre alınan yaprak, petiol ve internod eksplantlarının kallus oluşturma oranları (%)	124
4.54 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%).....	126
4.55 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	128
4.56 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili LSD gruplandırması	129
4.57 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	133

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.58 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	133
4.59 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	134
4.60 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları	135
4.61 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)	136
4.62 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet) ve ortalama yaprak uzunluğu (cm)	137
4.63 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında sürgülerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)	139
4.64 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA3 içeren WPM besin ortamlarında sürgülerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	139
4.65 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)	142

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.66 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	144
4.67 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili LSD gruplandırması	145
4.68 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%)	146
4.69 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)	148

1. GİRİŞ

Akdeniz Bölgesi'nin en eski, en yaygın ve önemli ürünlerinden olan zeytinin (*Olea europaea* L.) gen merkezi Anadolu'dur ve buradan Akdeniz kıyıları boyunca batıya doğru yayılmıştır (Rugini et al., 2005; Gürel vd., 2006). Son zamanlarda zeytin yetiştiriciliği dünya üzerinde yaygınlaştırılmasına rağmen, Akdeniz bölgesi, zeytinin asıl yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgedir ve dünyadaki zeytin ağacı varlığının %95'ine sahiptir (Rugini et al., 2005). İspanya ve İtalya zeytinyağı üretiminde en önemli paya sahip ülkeler olup, bunlarla birlikte dünya zeytinyağı üretiminin %75'ini Avrupa Birliği ülkeleri karşılamaktadır. Günümüzde, dünya üzerinde zeytin yetiştiriciliği yapılan alan yaklaşık 9.7 milyon hektardır (Cerezo et al., 2011).

Türkiye, dünya zeytin alanı varlığının %9'una, ağaç varlığının %17'sine, dane zeytin üretiminin %8'ine, zeytinyağı üretiminin %5'ine ve sofralık zeytin üretiminin %14'üne sahiptir (Tunalıoğlu, 2010). 2010 yılı FAO istatistiklerine göre, yaklaşık 20.5 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin % 98'ini İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Portekiz, Fransa ve Cezayir yapmaktadır. Bu ülkelerin kendi içindeki üretim dağılımlarının ise; %38 İspanya, %15 İtalya, %9 Yunanistan, %7 Türkiye, %5 Suriye ve %4 Tunus şeklinde olduğu görülmektedir. Ülkemiz gerek zeytin ağacı varlığı, gerekse zeytin üretiminde İspanya, İtalya, Yunanistan ve Fas'tan sonra gelmektedir. Türkiye, zeytin üreticisi ülkeler içerisinde hem zeytin üretim alanı (826.199 hektar) hem de zeytin üretimi bakımından (1.415.000 ton) 5. sırada yer almaktadır (FAO istatistikleri, 2010). Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı (TÜİK) 2011 yılı verilerine göre, zeytin üretimi 2010 yılında 1.415.000 ton iken 2011 yılında 1.750.000 ton'a ulaşarak %23.7 oranında bir artış göstermiştir (Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı, 2012a). Ayrıca yine TÜİK verilerine göre 2012 yılında zeytin üretiminde bir önceki yıla göre %4 oranında bir artış beklenmektedir (Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı, 2012b).

Zeytinyağı ilk üründür ve besinsel değerinden dolayı zeytinyağı tüketimi son yıllarda artmıştır. Zeytin aynı zamanda Akdeniz Ülkeleri'nde sofralık olarak da tüketilmektedir (Rugini et al., 2005). Zeytin üretiminin büyük bir kısmı yağ ekstraksiyonu için yapılmakla birlikte, yaklaşık %7-8'i sadece sofralık zeytin olarak yetiştirilmektedir (Khan et al., 2002; Gürel vd., 2006). Zeytinyağı üretiminden elde edilen prina yağı ve prina gibi yan ürünler ile bunların çeşitli kullanım alanları da (yakıt, gübre gibi) düşünüldüğünde, ana sektörlerle ek yan sektörlerde oluşmaktadır (Gürel vd., 2006).

Zeytinin 4000 yıldan fazla bir süredir yetiştiriciliği yapılmaktadır ve üretiminde tohum, gövde çelikleri, daldırma veya tohumun çimlendirilmesi ile elde edilen çöğürler üzerine aşılama gibi farklı metotlar kullanılmaktadır (Binet et al., 2007; Rostami and Shahsavar, 2012). Kültürel ve ekonomik öneme sahip olan zeytinin üretilmesinde aşı ya da yeşil çelik yöntemi tercih edilmektedir. Aşı yöntemi kullanıldığında üretim süreci 4-4.5 yıl olmaktadır. Yeşil çelikle üretimde ise bu süre 1-1.5 yıla inmektedir. Ancak tüm çeşitlerin bu yolla üretilmesi mümkün olmadığından, hızlı ve yoğun üretim sorunu halen çözümlenmiş sayılmamaktadır. Ayrıca, zeytin ağacı ve ürünleri birçok hastalık veya pestisitlerden zarar görebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, son yıllarda hızlı, yoğun ve sağlıklı üretim açısından doku kültürü yöntemlerinin üretime kazandırılması oldukça önem taşımaktadır (Gürel vd., 2006).

Günümüzde bitki doku kültürleri; çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, hastaliksız bitki elde edilmesinde ve kaybolmakta olan türlerin korunmasında rutin olarak uygulanmaktadır. Geleneksel üretim teknikleri kullanıldığında karşılaşılan bazı zorlukların üstesinden gelinebilmesi ve zeytinde genetik iyileştirmelerin yapılabilmesi açısından *in vitro* kültürler oldukça etkili olmaktadır (Gürel vd., 2006; Roussos and Pontikis, 2002). Bu yöntemlerin kullanılmasıyla üretim için temiz materyaller sağlanmakla birlikte, üretim için gerekli süre kısaltılarak üretim esnasında hız ve yoğunluk sağlanmaktadır (Lambardi et al., 2006).

Klonal çoğaltımda genotipi korumak esas olduğundan, *in vitro* üretimde apikal ve koltuk meristemlerinin, ya da uygulaması daha kolay olan ve gelişmesi yine meristemle sağlanan sürgün uçlarının veya nod eksplantlarının (boğumlu mikroçeliklerin) kullanılması önemlidir. Çünkü meristem dokularının genotip bakımından stabil olduğu bilinmektedir (Emiroğlu ve Gürel, 2005). D'Amato (1977)'ya göre bu durum, meristematik hücrelerin iki esas özelliği ile sağlanmaktadır: (a) DNA sentezi-mitoz düzeninin tam kontrol altında olması, dolayısıyla somatik poliploidiye yol açan ekstra DNA duplikasyonlarının olmaması; (b) hücrelerin çoğalma yeteneğine zarar veren spontan kromozom yapısı değişikliklerini ve diğer genetik bozuklukları, en azından kısmen elimine eden sürekli hücre bölünmesinin olması.

Bir tek bitkiden vejetatif olarak çoğaltılan ve aynı genotipi taşıyan bitkiler grubu bir “klon” oluşturmaktadır. Çok küçük bitki parçaları (eksplantlar) kullanılarak, laboratuvarında steril koşullarda yapılan vejetatif üretim “*in vitro* çoğaltım” ya da “mikroüretim” olarak adlandırılmaktadır. Geleneksel yöntemlerle vejetatif üretimi yavaş, zor hatta imkansız olan bazı bitkilerin klonal çoğaltımı *in vitro* kültürde sağlanabilmektedir. Ayrıca, mikroüretim, mevsime bağlı olmadan kontrollü koşullarda yıl boyunca yapılabilir ve çoğaltım potansiyelinin fazlalığı, stok bitkilerin muhafaza edilebilmesi, yer ihtiyacının az olması, olumsuz hava koşullarına, hastalık ve zararlılara karşı korunma gibi avantajları da vardır. Özellikle süs bitkilerinde geniş bir uygulama alanı olan *in vitro* çoğaltımdan yararlanılarak, ıslah çeşit ve hatlarının, kısa süre içinde ticari boyutta klonal çoğaltılması mümkündür (Emiroğlu ve Gürel, 2005).

Bitki doku kültürü işlemlerinde bitki rejenerasyonunun sağlanması ve klonal çoğaltımın başarılması oldukça önemlidir. Zeytin bitkisinde doku kültürü ile üretim çalışmaları 1980'li yıllardan bu yana uygulanmaktadır ve bazı çeşitlerde mikroçoğaltım konusunda ilerlemeler kaydedilmesine rağmen bu durum her çeşit için söz konusu değildir. Bugüne kadar zeytinde doku kültürü çalışmalarında başarıyı sınırlandıran faktörler; sürgün çoğaltım oranının genellikle düşük olması ve çeşide bağlı olması, köklenmenin zor elde edilmesi, aklimatizasyon aşamasında yüksek oranda bitki kaybının yaşanması, fenolik bileşiklerden kaynaklanan esmerleşme ve kararmalar, sistemik bulaşmalar ve ana bitkinin

fizyolojik durumu olmuştur. Ancak son yıllarda literatürlerde yer alan başarılı çalışmalar da mevcuttur. Özellikle İtalya’da gerçekleştirilen araştırmalarda doku kültürü ile ilgili metotların standardize edildiği ve fidancılık sektörüne aktarıldığı bilgileri mevcuttur (Rugini et al., 1999; Gürel vd., 2006).

Zeytin bitkisine ait birçok çeşitte nodal eksplantlar veya somatik embriyolar yolu ile mikroçoğaltım gerçekleştirilmesine rağmen, her çeşidin *in vitro* koşullara tepkisi farklı olduğundan her biri için ayrı ayrı üretim protokolünün oluşturulması gereklidir.

Bu tez kapsamında, insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemli bir ürün olan zeytinin köklenmesi nispeten daha kolay gerçekleşen “Gemlik” ve köklenmesi oldukça zor olan “Domat” çeşitlerinde *in vitro* koşullar altında farklı bitki büyüme düzenleyici içeriklerine sahip çeşitli besin ortamlarında sürgün rejenerasyon ve kallus rejenerasyon kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Bitkisel Özellikler

Zeytin bitkisi 29 cinse sahip *Oleaceae* familyasına dahildir ve 35 tür içeren *Olea* cinsi bunlardan birisidir. *Olea* cinsine ait bütün türlerin temel kromozom sayısı $2n=46$ ($x=23$)’dır (Rugini et al., 2005). *Olea* cinsi, hepsi nispeten güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir. Bunların çoğu çalılar veya ağaçlardır. Yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytininin dahil olduğu *Olea europaea* L.’dir (Shimon, 1998).

Sınıf : *Magnoliopsida*

Alt sınıf : *Asteridae*

Takım : *Scrophulariales*

Familya : *Oleaceae*

Alt familya : *Oleideae*

Cins : *Olea*

Tür : *Olea europaea* L.

Alt tür : *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* (= *O. europea* L. subsp. *sylvestris*) *Olea europaea* L. subsp. *sativa* (= *O. europea* L. subsp. *europaea*) (Mete ve Çetin, 2006)

Zeytin (*O. europaea* L.) tuza ve kurağa toleranslıdır ve fakir topraklarda dahi yetiştirebilmektedir. Bu özellikleri zeytini ayrıcalıklı kılmakta ve bu yüzden çok eski zamanlardan beri hem önemli bir ürün olarak yetiştirilmekte, hem de ağaçlandırma çalışmalarında kullanılmaktadır (Rostami and Shahsavar, 2012).

Zeytincilik, ülkemizde Cumhuriyet sonrasında tarımın en önemli faaliyet alanlarından biri haline gelmiştir. Atatürk’ün 1929 yılında Yalova bölgesine yaptığı bir gezide zeytinciliğe gereken önemin verilmesi konusundaki direktifleri doğrultusunda 1937 yılında Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsü kurulmuş ve zeytincilik konusunda araştırmalara başlanmıştır. Diğer taraftan zeytin bahçesine bakmayan ve bakım yaptırmayan üreticilere ceza verilmesine neden olan bir kanunun (26/01/1939 tarih ve 3573 sayılı “Zeytinciliğin Islahı ve Yabancılarının

Aşılattırılması Hakkında Kanun”) çıkarılması ile bu özelliğe sahip tek bitki olmuştur. Ülkemizde zeytincilik, yurt dışında eğitim görmüş uzmanlar tarafından yeni, bakımlı, sağlıklı ve verimli bahçeler tesis edilerek geliştirilmeye çalışılmış ve bu konuda önemli yol kat edilmiştir. Zeytinciliğe verilen bu önem, 1950’li yıllardan itibaren gittikçe azalmaya başlamakla birlikte 1961-62 döneminde Türkiye ilk zeytinyağı ihracatını yapmıştır. 1970’li yıllarda verimin düşük ve maliyetin yüksek olması nedeni ile kârlılık olumsuz yönde etkilenmiş ve zeytin yağı yerine rafinasyon ile elde edilen diğer bitkisel yağların üretim ve tüketimi teşvik edilmiştir. 1980’li yıllar ve sonrasında zeytinciliği koruma kanununa rağmen başka tarımsal faaliyet alanları açmak veya kıyı turizmi uğruna zeytin alanları tahrip edilmiştir. Sofralık zeytin ve zeytinyağı teknolojisini gelişmesi, bölgeleriyle özdeşleşen ve markalaşan zeytin çeşitlerinin zeytin ve zeytinyağı pazarının gelişmesine destek vermesinden dolayı ülkemizde 2000’li yıllardan bu yana özellikle de sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminde oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiştir ve dünyada söz sahibi bir ülke konumuna gelmiştir (Özkaya vd., 2012).

2.2 Zeytinde Çoğaltım Teknikleri

Çelikle üretim oldukça kolay olduğu için, elde edilen bitkisel materyal ana bitkinin özelliklerini ve genetik materyalini koruduğundan ve üretim için ana bitkiden bol miktarda materyal elde edilebildiğinden en çok tercih edilen üretim şeklidir (Kaya, 2006; Rostami and Shahsavar, 2012). Bu yöntemde ana bitkiden ayrılan yeşil dal çelikleri hormona batırıldıktan sonra, özel fiziksel şartların (sıcaklık, ışık, nem v.b.) oluşturulduğu bir serada köklenmeyi teşvik edici ortam içeren substratlara dikilmekte ve bu şekilde köklenmeleri sağlanmaktadır. Çeşitlere göre çelikle üretimde köklenme oranlarında farklılıklar gözlenmekte ve ekonomik öneme sahip bazı zeytin çeşitlerimizin (Domat, Memecik, v.b.) köklenme oranı çok düşük olmaktadır. Kaya (2006), çelikle üretimde Domat çeşidinde %10-15, Memecik çeşidinde %30-35, Ayvalık çeşidinde %60-70, Gemlik çeşidinde %80-90 ve Manzanilla çeşidinde %95-100 oranında başarı elde edildiğini rapor etmiştir.

Çelikle köklenmesi zor olan ve bu tip üretimle ekonomik olarak üretilmeyen çeşitlerden fidan elde edilebilmek için aşıyla üretim yapılmaktadır. Aşıyla üretimde, genellikle yabani ya da kültür çeşidi zeytin tohumlarından elde edilen çöğürler anaç olarak kullanılmaktadır. Zeytin çekirdekleri yapısal özellikleri nedeniyle güç ve düşük düzeyde (%13) çimlenmektedirler. Aynı zamanda çekirdeklerden elde edilen çöğürler; heterezigot olmaları nedeniyle her biri farklı özellik göstermektedirler (Özen ve Kaya, 2007). Bundan dolayı kullanılan anacın özelliklerinin ne olduğu bilinmemektedir. Bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak için köklenme oranı yüksek, hastalık ve zararlılara, kuraklığa ve soğuğa dayanıklı olduğu bilinen klonal anaçların kullanılması daha önemlidir. Ayrıca, aşılı fidan üretiminde, çöğür olarak kullanılan tohumun hasadından aşılı fidanın satış aşamasına kadar yaklaşık 5 yıla ihtiyaç duyulmaktadır. Bu süre üretim için oldukça uzun, masraflı, ayrıca üretim süresince kayıplar oldukça yüksek olmakta ve aşı ile üretim özel işçilik gerektirmektedir (Kaya, 2006).

Bahsedilen bu klasik çoğaltım yöntemleri, zeytin bitkisinin üretiminde yetersiz kalmakta ve hatta bazı çeşitlerde sınırlı bir üretim söz konusu olmaktadır. Bu yüzden zeytinin *in vitro* çoğaltımı ile klasik üretim tekniklerinde karşılaşılan bazı zorlukların üstesinden gelinebilmektedir (Rugini, 1995; Rugini et al., 1999; García-Férriz et al., 2002).

2.3 Zeytinin Doku Kültürü İle Üretimi

Zeytinde farklı çeşitlerde; aksillar tomurcukların uyarılması (nod kültürü), organogenez ve somatik embriyogenez yolu ile mikroçoğaltım yapılabilmektedir (Rugini and Gutiérrez-Pesce, 2006).

Olea europaea türlerinde *in vitro* çoğaltım verimi genellikle kültür ortamına (Rugini, 1984; Sghir et al., 2005; Brito and Santos, 2009), genotipe (Zuccherelli and Zuccherelli, 2002; Giorgio et al., 2006), bitki büyüme düzenleyicilerine (Peixe et al., 2007) ve karbon kaynağına (Leva et al., 1994; Sghir et al., 2005) bağlıdır. Özellikle rekalsitrant zeytin çeşitlerine spesifik besin ortamları, embriyo veya genç sürgünlerden mineral elementlerin analizi ile belirlenmiştir (Rugini, 1984; Ali et al., 2009).

Zeytinin olgunlaşmış dokularının *in vitro* tekniklere gösterdiği rekalsitrant tepkilerden dolayı bu bitkide olgunlaşmış dokulardan *in vitro* manipülasyon oldukça zordur ve bu durum biyoteknolojik ilerlemeleri yavaşlatmaktadır. Ancak olgunlaşmamış zigotik embriyolar, kotiledonlar ve olgun embriyoların radikulları olduğu kadar çim bitkilerinin kökleri gibi farklı embriyo kökenli genç dokular eksplant olarak kullanılarak somatik embriyolardan bitki rejenerasyonları gerçekleştirilebilmiştir. Fakat somatik embriyoların üretimi için gerekli protokoller mevcut olmasına rağmen, bir sonraki aşama olan embriyoların bitkiye dönüşüm oranları oldukça düşüktür ve bu durum büyük çaplı bitki çoğaltımı, krayoprezervasyon veya genetik transformasyon gibi zeytinde çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için somatik embriyoların kullanımını zorlaştırmaktadır (Rugini et al., 2005; Cerezo et al., 2011). Ayrıca, embriyolardan elde edilen eksplantların kullanılması, özellikle seçilmiş bir çeşidin veya klonun çoğaltımında elverişli değildir (Özden vd., 2010). Picual zeytin çeşidinde olgun embriyoların *in vitro* çimlendirilmesi ile elde edilen radikulalardan (Cerezo et al., 2011), Manzanillo çeşidinde olgunlaşmamış kotiledon parçalarından (Leva et al., 2006), Chemiali of Sfax ve Meski çeşidinde genç zigotik embriyolardan (Maalej et al., 2002) somatik embriyogenez yolu ile üretim gerçekleştirilmiştir.

Cerezo et al. (2011), Picual çeşidinde yaptıkları çalışmada somatik embriyogenez ile etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Olgunlaşmış tohumlardan izole edilen radikullar, 2.5 μ M 6-(dimethylallylamino) purine (2İP) ve 25 μ M indole-3-butyric acid (IBA) eklenmiş modifiye OM (Omc) ortamında 3 hafta kültüre alınmış ve daha sonra 2İP içermeyen ve daha düşük konsantrasyonda IBA içeren aynı besin ortamına transfer edilerek %25 oranında embriyogenik kültürler elde edilmiştir. İki farklı temel ortam; Omc ve olive cyclic embryogenesis medium (ECO) [$\frac{1}{4}$ OM makroelementleri, $\frac{1}{4}$ MS mikroelementleri ve 550 mg/l glutamin ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ OM vitaminleri] embriyogenik kallus çoğaltımı ve olgunlaşması açısından test edilmişler ve embriyogenik kallusun büyüme oranı bakımından her iki ortam aynı bulunmuştur. Ancak; embriyolar ECO besin ortamında kültüre alındıklarında, olgun embriyoların rejenerasyonu oldukça yüksek olmuştur.

Cañas and Benbadis (1988), Tanche ve Picula çeşidinde kallustan bitki rejenerasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada, bu çeşitlere ait tohumlardan izole edilen embriyoların kotiledonlarını eksplant olarak kullanmışlardır. Kotiledon parçaları hücre bölünmesi ve kallus oluşumunu başlatmak amacıyla öncelikle yüksek seviyede oksin (5 mg/l IBA) ve düşük seviyede (0.2-0.5 mg/l) 2İP veya zeatin içeren modifiye OM (Omc) ortamında kültüre alınmışlar, daha sonra büyümeyi devam ettirmek ve organ veya sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla farklı seviyelerde IBA ve/veya 2İP içeren Omc ortamlarına aktarılmışlardır. 1 mg/l IBA içeren Omc ortamında en yüksek kök rejenerasyonu, 4 mg/l 2İP içeren ortamda ise en yüksek sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Rejenere olan sürgünler 1 mg/l IBA veya naftelen asetik asit (NAA) içeren başka bir modifiye OM ortamına (Omr) aktarılınca tam bitkiye dönüşmüşlerdir. Aklimatizasyonda %75-80 başarı elde edilmiştir.

Özgen (1999), Ayvalık ve Gemlik çeşidini kullanarak yaptığı çalışmada somaklonal varyasyonlardan yararlanmak amacı ile zeytinde kallus oluşumu üzerine farklı bitki büyüme düzenleyicileri, bunların kombinasyonları ve konsantrasyonlarının, eksplantların, dönemin, aydınlık ve karanlık gibi faktörlerin etkilerini araştırmıştır. Kallus oluşumunu en iyi 1.0 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OM ortamında aydınlık koşullarda elde etmiştir. Ayvalık çeşidi kallus oluşumunda Gemlik çeşidinden daha iyi bulunmuş ve en iyi kallus gelişimi Aralık-Ocak aylarında kültüre alınan petiol eksplantlarında gözlenmiştir. Sürgün üzerine yaptığı denemede ise en iyi sürgün gelişimini Nisan ve Mayıs aylarında bir yıllık Gemlik sürgünlerinden alınan eksplantlarda, 4 mg/l zeatin içeren besin ortamında elde etmiştir. *In vitro* sürgünlerden alınan yapraklarda en iyi kallus oluşumu 1 mg/l IBA ve 0.5 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiş fakat herhangi bir rejenerasyon elde edilememiştir. Internodyumlar ve petiollerde ise birkaç bitkide 4 mg/l zeatin ve 0.5 mg/l IBA içeren ortamda sürgün rejenerasyonları elde edilmiştir.

Zeytin bitkisinin mikroçoğaltımı yüksek maliyetten dolayı, henüz klasik üretim metotlarının (aşı ve çelik) yerini istenilen düzeyde alamamıştır. Zeytinin büyük çaplı mikroçoğaltımı, her çeşide özgü ayrı ayrı üretim protokollerinin optimizasyonunu gerektirmektedir. Zeytinin mikroçoğaltımla üretiminde en kritik

aşama eksplantların *in vitro* koşullara adaptasyonudur. Bu aşamada aksillar tomurcukların sürmesini teşvik etmek için oksin/sitokinin seviyelerini dengelemek önemlidir. Birinci aşama başarıldıktan sonra, köklenme aşaması çok kritik değildir (Zuccherelli and Zuccherelli, 2002).

Seyhan ve Özzambak (1994), Türkiye’de ticari öneme sahip ve köklenmesi zor olan Mememecik ve Domat çeşitlerinde yaptıkları çalışmada sürgün çoğaltımını ve BAP’ın farklı konsantrasyonlarının sürgün çoğaltımı üzerine etkisini araştırmışlardır. 5-10 yıllık klon anaçlardan farklı zaman periyotlarında alınan genç sürgünler üzerindeki toz partiküller gidinceye kadar akan suyun altında yıkanmış, akabinde nodal segmentlere ayrılan bitkisel materyal deterjanla yıkandıktan sonra %60’lık etanole batırılmışlardır. %10’luk tween eklenmiş sodyum hipoklorit solüsyonunda 15 dakika süreyle steril edilen eksplantlar, en son olarak 4 kez steril saf su ile çalkalanmışlardır. Kültüre alınmadan önce eksplantlar, 3 saat steril saf su içerisinde bekletilmiştir. Çalışmada 3., 4. ve 5. nodlar eksplant olarak kullanılmış ve steril edildikten sonra 0.5 mg/l BAP içeren modifiye OM başlangıç ortamında kültüre alınmışlardır. Kültürler, 7 gün süre ile karanlıkta muhafaza edilmiş daha sonra 16 saatlik fotoperiyot koşullarına transfer edilmişlerdir. Kültürden 35-40 gün sonra iyi büyüme gösteren sürgünler, farklı seviyelerde BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/l)’ın 0.05 mg/l NAA ile kombine edildiği OM sürgün çoğaltım ortamlarına aktarılmışlardır. Maksimum sürgün sayısı; 0.05 mg/l NAA+1.0 mg/l BAP içeren besin ortamında, maksimum sürgün uzunluğu ise 0.5 mg/l BAP içeren besin ortamında elde edilmiştir.

Zuccherelli and Zuccherelli (2002), Akdeniz Bölgesi’nde yetişen 50 önemli çeşidin üretimi için mikroçoğaltımın kullanılma olasılığını araştırmışlar ve o zamana kadar geliştirilen mikroçoğaltım prosedürlerini ticari üretime uygun olacak şekilde modifiye ederek bu çeşitlere uygulamışlardır. Araştırmacılar çalıştıkları çeşitleri *in vitro* koşullara verdikleri tepkilere göre üç gruba ayırmıştır: Leccino ve Picholine gibi rekalsitrant çeşitler, Pendolino ve Frantoio gibi orta düzeyde zorluğa sahip çeşitler ve Arbequina, Barnea ve Hojiblanca gibi *in vitro* koşullarada üretime oldukça yatkın çeşitler. Bu üç gruptan kolay ve orta düzeyde zorluğa sahip çeşitlerin ticari boyutta büyük çaplı üretimlerinin gerçekleştirilebileceğini fakat rekalsitrant türler için tekniğin optimize edilmesi

gerektiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Giorgio et al. (2006), Akdeniz Bölgesinde yetişen 18 önemli çeşit için *in vitro* çoğaltım aşamasından serada aklimatizasyon aşamasına kadar uygun bir protokol geliştirmeye çalışmışlardır. Yapılan bu çalışmada Arbequina, Ascolana, Biancolilla, Canino, Coratina, Frantoio ve Gentile di Larino çeşitlerinin kısa sürede *in vitro* kültürleri oluşturulmuş ve aklimatizasyonları yapılmıştır.

İki zeytin çeşidi Kalamon ve Koroneiki *in vitro* sürgün ve kök rejenerasyonu açısından karşılaştırılmışlar. Tek nodlu eksplantlar 100 mg/l myo-inositol, 2 mg/l glisin, 0.5 mg/l nikotinik asit, 0.5 mg/l pridoksin-HCl, 0.1 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l IBA, 10 mg/l BAP, 30 g/l sukroz ve 6 g/l agar içeren ½ MS ortamında kültüre alınmışlardır. Kök gelişimi için de Knop makroelementleri ve Heller mikroelementlerini yarı veya tam konsantrasyonda içeren, 160 mg/l putresin, 1 mg/l NAA, 20 g/l sukroz ve 7 g/l agar eklenmiş ortamlar kullanılmıştır. İki çeşidin rejenerasyon kapasitelerinde farklılıklar gözlenmiştir. Kalamon çeşidi sürgün rejenerasyonu ve kök oluşmu açısından Koroneiki çeşidinden daha zayıf kalmıştır (Ozkaya et al., 2003).

Sghir et al. (2005), kolay köklenen ZDH4 ve Lucques, orta düzeyde köklenme kabiliyetine sahip Haouzia, Dahbia, Amellau ve Salonenque ve zor köklenen Picholine marocaine ve Picholine du Languedoc çeşitlerinin mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, bu çeşitlere ait tek nodlu gövde parçalarını %3 sukroz ve 8.8 µM BA veya 8.8 µM BA ve 0.26 NAA veya 13.6 µM zeatin içeren OM ortamında kültüre almışlar ve bu kültürleri 25/22 °C gün/gece sıcaklığında, 16 saat aydınlık periyotta ve 40 µmol/m²s ışık şiddetinde muhafaza etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre her çeşidin kullanılan ortamlara farklı tepkiler verdiği ve mikroçoğaltımı en kolay olan çeşidin Haouzia olduğu rapor edilmiştir. Tüm kültürler için en iyi sonuçlar zeatin içeren ortamlardan elde edilmiştir. Oluşan *in vitro* sürgünleri ise köklenme için 5.37 µM NAA veya 24.6 µM IBA içeren OM ortamına aktarmışlar veya iki fazlı olarak; önce sürgünleri 5 gün indüksiyon aşaması için 24.6 µM IBA solüsyonunda karanlıkta bekletmişler ve daha sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen OM ortamına transfer etmişlerdir. En iyi köklenme oranı iki fazlı kültürde ve Salonenque (%70) ve Picholine marocaine (%65) çeşitlerinde gözlenmiştir.

Arbequina, Picual ve Empeltre kültür varyetelerinin tarlada büyüyen olgun ağaçlarından toplanan uç sürgünleri 2 yıllık zeytin fidanları üzerine aşılanmış ve bir yıl sonra yeni oluşan 10-15 cm büyüklüğündeki sürgünlerden alınan tek nodlu eksplantlar *in vitro* kültür için başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar başlangıçta 1 mg/l BAP içeren ½ Rugini Olive Medium (ROM)'da kültüre alınmış. Üç hafta sonunda sürgün veren nodlar sürgün çoğaltımı açısından karşılaştırma için, değişik konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5 µM) BAP büyüme düzenleyicisini tek başına içeren veya BAP ile kombine edilmiş 1 µM thidiazuron (TDZ) içeren modifiye MS (Murashige and Skoog, 1962) ve ROM ortamlarına aktarılmıştır. Test edilen temel besin ortamlarından en iyi sonuçlar ROM'dan elde edilmiştir. BAP'ın tüm konsantrasyonlarının TDZ ile kombinasyonları, BAP'ın tek başına kullanıldığı konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar vermiştir. Sürgünler 45 mm uzunluğuna eriştiğinde ilk önce beş gün süre ile %2 sukroz, 3 mg/l AIB ve 2 mg/l AIA içeren steril olmayan bir solüsyon içine yerleştirilmişler, daha sonra bir substrata transfer edilerek %100 nemde tutulmuşlardır. Bu şekilde dış koşullara aktarılan sürgünlerin %75'i 25-35 gün sonra kök oluşturmuştur (García-Férriz et al., 2002).

Meski çeşidinde yapılan çalışmada *in vitro*'da yetiştirilen sürgünlerden alınan tek nodlu eksplantlarda en iyi büyüme oranı kültürden 75 gün sonra 1mg/l zeatin içeren OM ortamında 11 nodlu yaklaşık 17 cm uzunluğunda sürgünler olarak gözlenmiştir. Köklendirme için sürgünler 3 g/l aktif karbon içeren besin ortamına aktarılmadan önce, 1 g/l konsantrasyondaki IBA solüsyonuna batırılmış ve yaklaşık %100 köklenme elde edilmiştir (Chaari et al., 2002).

Roussos and Pontikis (2002), Koroneiki çeşidi için uygun mikroçoğaltım prosedürü geliştirmişlerdir. Bu çeşidin 20 yıllık ağaçlarından kışın alınan 10-15 cm uzunluğundaki genç sürgünleri eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Koroneiki çeşidinin tek nodlu eksplantları büyüme düzenleyicisi içermeyen modifiye Driver-Kuniyuki (DKW) ortamında kültüre alınmışlardır. Bu eksplantlar ayda bir kez zeatin riboz, 6-(γ- γ-dimethylallylamino) purin, 6-benzyladenin veya thidiazuron içeren ortamlarda altkültüre alınmışlardır. Zeatin ribozun sürgün çoğaltımının uyarılmasında diğer sitokinlerinden üstün olduğu belirlenmiştir. Çoğaltım aşamasında 2 ay sonra eksplantlar IBA, NAA veya IBA+NAA içeren 1

ml sıvı WPM ortamında karanlıkta kültüre alınmışlardır. Daha sonra eksplantlar büyüme düzenleyicisi içermeyen yüzeyi ince bir perlit tabakası ile kaplı aynı katı ortama transfer edilmişlerdir. İki oksinin 1+1 mg/l şeklinde kombinasyonu %76 köklenme sağlamıştır. 50 mg/l zeytin budak ekstraktı ile oksinin kombinasyonu sonucunda ise köklenme yaklaşık olarak %87 oranına ulaşmıştır. Aklimatize edilen sürgünlerin %75'i canlı kalabilmiştir.

Chondrolia Chalkidikis çeşidinde yapılan mikroçoğaltım çalışmasında, temel besin ortamlarının (WPM, Quoirin and Lepoivre (QL) ve OM) ve değişik konsantrasyonda sitokininlerin (BA, zeatin, 2İP) tek başına ya da birbirleri ve GA₃ ile kombinasyonlarının *in vitro* çoğaltım üzerine etkileri araştırılmıştır. WPM besin ortamı morfolojik olarak daha iyi görünümlü mikrosürgünler üretmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün oluşumu (1.68 adet, 3.0 cm uzunluğunda ve 4.2 çoğaltım oranına sahip) 20 µM zeatin içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Besin ortamına 5-20 µM zeatin ve 1 µM BA eklendiğinde, eksplant başına mikrosürgün sayısı (1.85) ve çoğaltım oranı (6.8) artmış fakat sürgün uzunluğu azalmıştır. Denemede araştırılan yapılan sitokininler arasında 2İP en az etkili bulunmuştur. Zeatin (20 µM) ve GA₃ (10 µM) kombinasyonu sürgün çoğaltımını olumlu yönde etkilemiş ve eksplant başına 1.80 adet mikrosürgün, 3.0 cm sürgün uzunluğu ve 7.0 çoğaltım oranı elde edilmiştir. Ancak aynı konsantrasyonda GA₃'ün 1 µM BA ile kombinasyonu eksplant başına sürgün sayısını (0.48) ve çoğaltım oranını (2.4) düşürürken, sürgün uzunluğunu (2.7) çok fazla değiştirmemiştir. Köklenme üzerine IBA, NAA ve putresinin etkisi de araştırılmıştır. Mikrosürgün başına 2.3 adet kök ve %70'lik köklenme oranı 12 µM IBA ve 3 µM NAA içeren besin ortamında elde edilmiş ancak sürgün ucu ve yapraklarda absisyon gözlenmiştir. Aynı ortama 30 µM putresin eklenmesi ile köklenme oranı %93 ve mikrosürgün başına kök sayısı 4'e yükselmiş ve sürgünlerde hiçbir yan etki görülmemiştir. Aklimatize edilen sürgünlerin %90'ı canlı kalmıştır (Grigoriadou et al., 2002).

Zeytincilik Araştırma İstasyonu ile Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nün 2005 yılında birlikte yürüttükleri çalışma ile bazı zeytin çeşitlerinin *in vitro* koşullarda farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren kültür ortamlarında gösterdikleri rejenerasyon tepkileri belirlenmiştir. Çalışmada

Çelikle etimi kolay bir çeşit olan Gemlik, elikle etimi zor olan ve aşıyla etilen Domat eşidi ve D-36 delice anacına ait tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve bazen 6. nodları 5 mg/l BA ya da 5 mg/l zeatin içeren OM başlangıç (Olive Medium), MSM ve WPM kültür ortamlarına aktarılmıştır. Araştırmada en fazla sürgün gelişimi zeatin ilave edilmiş OM başlangıç ortamında gözlenmiştir. Gemlik eşidinde kültüre alınan eksplantlar BA ilave edilen OM başlangıç ortamında 15 gün içinde kallus oluşturmuş ve oluşan kalluslardan her hangi bir sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Zeatin ilave edilen kültürlerde ise %68.2 oranında sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Kültüre alınan Gemlik eksplantlarında materyalin %17.4' kararmış, %6.83' ise kallus oluşturmuştur. Ayrıca, sürgün çoğaltım ortamlarında %61.7 oranında başarı sağlanan Gemlik çeşidine ait sürgünler 160 mg/l putresin ve 1.5 mg/l NAA içeren OM ortamına aktarıldıklarında %36.5 oranında kök oluşturmuşlardır. Domat eşidinde ise %34.9 kontaminasyon ve %18 kararma gözlenmekle beraber %18.37 oranında sürgün oluşumu ve %1.37 kallus oluşumu grlmştir. D-36 eşidinde OM başlangıç ortamına aktarılan eksplantların %31.4'nde kontaminasyon, %14.7'sinde kararma ve %57.47'sinde sürgün oluşumu kaydedilmiştir (Gürel vd., 2006).

Fransız zeytin eşitleri olan Aglandau ve Tanche için maksimum sürgün gelişimi (sırasıyla, 3.0 ve 1.4 adet) ½ konsantrasyonda makro element, 30 g/l sukroz ve 4 mg/l zeatin içeren modifiye zeytin ortamından elde edilirken, köklenme (sırasıyla, %80.3 ve %62.7) 4 mg/l IBA içeren modifiye zeytin ortamında gerçekleşmiştir. Laragne eşidinde maksimum sürgün sayısı (2.0 adet) 15 g/l sukroz ve 0.1 mg/l zeatin içeren WPM besin ortamında, en iyi köklenme (%78.0) ise 1 mg/l IBA+0.75 mg/l NAA içeren WPM ortamında gözlenmiştir (Binet et al., 2007).

In vitro kültür ortamında mineral formülasyonun yanı sıra büyüme düzenleyicileri de diğer önemli bileşenlerdir. Rugini (1984)'nin öncülük ettiği çalışmadan bu yana, kültüre alınan zeytin eksplantlarında en iyi sürgün gelişiminin zeatin içeren besin ortamlarında meydana geldiği rapor edilmiştir. Zeatin genellikle besin ortamlarında çeşide göre 4.5-45.62 M arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Zeatinin yüksek maliyetinden dolayı zeytin

bitkisinin ticari mikroçoğaltımını mümkün kılmak için, yapılan çalışmalarda zeatine alternatif daha ucuz bitki büyüme düzenleyicisi bulma arayışına gidilmiştir. Zeatine bir alternatif thidiazuron (TDZ) ve BAP'tır. Yine de TDZ pahalı bir kimyasaldır ve zeatinin yerine kullanımının sağladığı ekonomik yararlar henüz bulunmamaktadır (Peixe et al., 2007). Ekonomik öneme sahip olan ve zor köklenen Galega vulgar çeşidinde etkili bir mikroçoğaltım geliştirmek için, hindistan cevizi sütü, kinetin ve BAP'ın zeatin yerine kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır (Peixe ve ark., 2007). Haziran ayında 8 yıllık ağaçların aktif büyüyen sürgünlerinden alınan tek nodlu (2.-5. nod arası) eksplantlar 3 adımlı bir sterilizasyon prosedürü ile steril edilmişlerdir: 3 saat akan suyun altında yıkama, %1 (w/v) Benomyl solüsyonu ile 50 dakika muamele ve ardından 3 defa steril saf su ile yıkama, 3 damla Tween 20 eklenmiş %0.2 (w/v) HgCl₂ ile 10 dakika çalkalama ve en son olarak 3 defa steril su ile yıkamak. Sterilizasyondan sonra eksplantlar 2.22 µM BAP, 2.32 µM kinetin ve 2.28 µM zeatinin ayrı ayrı ya da 50 ml/l hindistan cevizi sütü ile kombine edildiği 30 g/l sukroz ve 7 g/l agar-agar içeren OM ortamında kültüre alınmışlardır. Kültürler 24 °C/21°C gün/gece sıcaklığı uygulanan, 15 saat ışıklandırma periyotlu ve 36 µmol/m²s ışık şiddetli fiziksel koşullarda muhafaza edilmişlerdir. Bu ortamlardan elde edilen sürgünler 8.87 µM BAP ve 9.12 µM zeatinin tek başına veya 50 ml/l hindistan cevizi sütü ile kombine edildiği 30 g/l mannitol ve 7 g/l agar-agar içeren OM besin ortamlarında altkültüre alınmışlardır. Köklendirme için sürgünler ya direkt 4.9 µM IBA ve 2 g/l aktif karbon içeren OM ortamına aktarılmış ya da sürgünlerin bazal kısımları 10 saniye süresince 14.700 µM (3 g/l) steril IBA solüsyonuna batırıldıktan sonra büyüme düzenleyicisi içermeyen ve içerisinde 2 g/l aktif karbon bulunan OM ortamına aktarılmışlardır. Kültürün kurulma aşaması için en iyi sonuçlar 2.22 µM BAP+50 ml/l hindistan cevizi sütü içeren besin ortamından elde edilmiştir. *In vitro* çoğaltım aşaması için en yüksek çoğaltım oranı (ortalama 3.4 yeni eksplant) 8.87 µM BAP+50 ml/l hindistan cevizi sütü içeren ortamda oluşmuştur. Köklendirme oranı en yüksek (%85) eksplantların bazal kısmının 10 saniye süresince 3 g/l IBA solüsyonuna batırıldığı uygulamadan elde edilmiştir (Peixe et al., 2007).

Yapılan bir çalışmada *Chondrolia Chalkidikis* çeşidinin *in vitro* çoğaltımı ve vitrifikasyon üzerine sitokin ve giberellik asit seviyeleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. BA ve GA₃ ayrı ayrı 0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l konsantrasyonlarda ve sırasıyla 0+0, 0.5+0.5, 1.0+1.0, 2.0+2.0 ve 4.0+4.0 mg/l kombinasyonlarında OM ortamına eklenmiş ve tek nodlu eksplantlar bu ortamlarda kültüre alınmıştır. Kùltürler 22±2°C’de, 90 µmol/m²s ışık şiddetinde ve 16 saatlik fotoperiyotta muhafaza edilmişlerdir. Kùltürden 8 hafta sonra, en yüksek çoğaltım oranı (3.5) 2.0+2.0 mg/l BA+GA₃ içeren besin ortamında gözlenmiştir. Ancak, tüm hormon denemelerinde %100 vitrifikasyon gözlenmiştir. Bu problemi ortadan kaldırmak için eksplantlar ilk önce 2 veya 4 gün süre ile 2.0 mg/l BA içeren OM ortamında kültüre alınmış, ardından 0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l GA₃ içeren besin ortamına aktarılmışlardır. Eksplantların başlangıçta kısa bir süre için BA içeren besin ortamına aktarılması, GA₃ konsantrasyonu ne olursa olsun vitrifikasyon sorununu azaltmakla birlikte 1.0 mg/l GA₃ içeren ortamda en fazla ve en uzun sürgünler elde edilmiştir (Antonopoulou et al., 2006).

Mendoza-de Gyves et al. (2008), Canino, Frantoio, Moraiolo, Rosciola ve Piantone di Moiano çeşitlerinin mikroçoğaltımında farklı bir büyüme düzenleyicisi olan dikegulak’ı kullanarak bu büyüme düzenleyicisinin *in vitro*’da apikal dominansiyi azaltma ve akabinde nodlardaki yanal tomurcukları uyarıp sürgün verme potansiyelini araştırmışlardır. Materyal olarak *in vitro*’da üretilen sürgünler kullanılmıştır. İki yapraklı nodal segmentler 4.5 µM zeatin ve farklı konsantrasyonlarda (0.0, 16.9, 33.8, 66.7, 100.5 and 133.4 µM) dikegulak içeren OM ortamlarında kültüre alınmışlar ve 24±1°C sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 40 µmol/m²s ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Dikegulak’a verdikleri tepkilere göre çeşitler iki gruba ayrılmıştır. Canino, Frantoio ve Moraiolo belirli bir miktara kadar sürgün çoğaltımını arttırmıştır. Sürgün uzunluğunu azaltmadan en fazla sürgün oluşumu 66.7 µM konsantrasyonda gözlenmiştir. En fazla sürgün (42 adetten fazla) 100.5 µM konsantrasyonda gerçekleşmiş, fakat sürgün uzunluğu azalmıştır. Daha yüksek konsantrasyonda (133.4 µM) sürgün sayısı oldukça düşmüştür. Dikegulak kullanımı Rosciola ve Piantone di Moiano çeşitlerine etki etmemiştir. Köklenme aşamasında, Canino, Frantoio ve Moraiolo çeşitlerine ait 3-6 nodlu sürgünler 0.4 mg/l IBA, 160 mg/l putresin, %2 sukroz ve %0.7 agar içeren Bourgin and Nitsch

(1967) ($\frac{1}{2}$ makroelement içeren) ortamında kültüre alınmışlar ve kültürler 5 gün karanlıkta tutulduktan sonra aydınlık ortama alınmışlardır.

In vitro kültür ortamlarındaki bir diğer önemli bileşen enerji kaynağıdır ve sukroz bu amaçla en çok kullanılandır. Leva et al. (1994) zeytin mikroçoğaltım ortamında sukroz yerine mannitol kullanarak bu konuya önemli bir katkıda bulunmuşlardır. Maurino çeşidinde yaptıkları çalışmada farklı seviyelerde (17, 34, 68 g/l) sukroz ve mannitolün sürgün gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirmişlerdir. Çeliklerden alınan genç sürgünler (Temmuz ayı) tek nod içerecek şekilde steril edilmiş ve 10 μ Mol zeatin ve yukarıdaki konsantrasyonlarda sukroz veya mannitol içeren modifiye MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Dört altkültür sonunda büyüme oranları (cm) ve nod sayıları belirlenmiştir. En fazla büyüme oranı (4.6 cm) ve en fazla nod sayısı (12.3 adet) 34 g/l mannitol içeren ortamda gerçekleşmiştir. Mannitol kullanımından kaynaklanan kültür ortamı maliyetindeki artış, yüksek çoğaltım oranı ve sürgün büyüme kapasitesi ile karşılaştırıldığında göz ardı edilebilmektedir. Benzer şekilde García et al. (2002), Manzanillo çeşidinde yaptıkları mikroçoğaltım denemelerinde mannitol kullanımının sürgün uzunluğunu arttırdığını ve apikal dominansinin kırılmasına etki ettiğini rapor etmişlerdir.

Briccoli Bati et al. (2006), Carolea ve Nocellara Etnea çeşitlerinde yaptıkları çalışmada mikroçoğaltımla elde edilen bitkilerin vejetatif ve verim performansını çelikle ve aşı ile üretilen bitkilerle karşılaştırmışlardır. Tek nod içerecek şekilde kesilen eksplantlar steril edildikten sonra 20 g/l mannitol ve 2.5 g/l phytigel içeren OM başlangıç ortamında kültüre alınmışlar. Oluşan sürgünler 4 mg/l zeatin ve 30 g/l mannitol içeren modifiye OM ortamında ($\frac{1}{2}$ makro element içeren) ayda bir altkültüre alınarak çoğaltılmışlardır. Dört yıl altkültürden sonra 3-4 nodlu sürgünler 160 mg/l putresin ve 2 mg/l IBA içeren $\frac{1}{2}$ OM ortamında köklenme için kültüre alınmışlardır. Köklü bitkiler daha sonra dış koşullara aktarılmıştır. Aynı yaştaki aşı, çelik ve mikroçoğaltımla üretilen bitkiler dikildikten sonra çiçek tomurcuğu farklılaşma yüzdesi, meyve ağırlığı, verim, budama materyali ve gövde çapı bakımından karşılaştırılmışlardır. Dikimden 2 yıl sonra çiçeklenme bakımından çeşitler arasında oldukça farklılıklar gözlenmiştir. Mikroçoğaltımdan gelen bitkiler 2 yıldan önce meyve verirken aşı ile üretilen bitkilerde bu süre

içerisinde meyve oluşumu gerçekleşmemiştir. Dikimden 8 yıl sonra, Nocellara Etnea çeşidinin toplam verimi Carolea çeşidinin toplam veriminin neredeyse 2 katı kadar bulunmuştur. Mikroçoğaltımdan gelen bitkilerin verimi, aşı ile üretilen Nocellara Etnea çeşidinin veriminden kısmen yüksek, fakat meyve ağırlığı önemli oranda düşüktür. Mikroçoğaltımla üretilen Carolea çeşidine ait bitkiler aynı çiçek tomurcuğu oluşum yüzdesi gösterse de, zayıf meyve oluşumu yüzünden deneme yapılan periyot içerisinde toplam verim oldukça düşük olmuştur. Elde edilen sonuçlardan, mikroçoğaltım tekniğinin, uygulama yapılan çeşitlerde vejetatif ve verim özelliklerini değiştirmedeği ortaya çıkmaktadır.

Benzer şekilde Leva et al. (2002), *in vitro*'da çoğaltılan Maurino çeşidinin bitkiciklerini tarlaya aktararak büyüme ve gelişme davranışlarını incelemiş ve çelikle üretilen bitkilerle karşılaştırmışlardır. Mikroçoğaltım ile üretilen bitkilerin tarla performansında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

In vitro teknikler tehlike altındaki türlerin korunması amacı ile de kullanılabilmektedirler. Zacchini and De Agazio (2004), tehlike altındaki Nebbiara zeytin çeşidini korumak amacı ile *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Tarlada yetişen 50 yıllık ağaçlardan alınan 3 cm uzunluğundaki nodal segmentler sterilizasyondan sonra 36 g/dm³ mannitol ve 4.56 µM zeatin içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Buradan elde edilen sürgünler en iyi 36 g/dm³ mannitol, 13.68 µM zeatin, 4.33 µM GA₃ ve 0.49 µM IBA içeren OM ortamında çoğaltılmışlardır. Sürgünlerin köklendirilmesi ½ konsantrasyonda makro element, 20 g/dm³ sukroz ve 3.22 µM NAA içeren OM ortamında gerçekleştirilmiş ve kültür başlangıcında sürgünler 5 gün karanlıkta bırakıldıktan sonra 16 saatlik fotoperiyoda alınmışlardır.

Aynı şekilde Santos et al., (2003), tehlike altındaki *Olea europaea* ssp. *maderensis*'de yaptıkları çalışmada mikroçoğaltım için uygun prosedürü belirlemeye çalışmışlardır. *Olea europaea* ssp. *maderensis*'in olgun ağaçlarından toplanan 15-20 cm uzunluğundaki çeliklerin yaprakları kesilerek gövdeler tek nod içerecek şekilde kesilmiştir. Eksplantlar öncelikle 10 dakika akan suyun altında yıkanmış sonra %70'lik etil alkole 30 saniye süre ile batırılmışlardır. Daha sonra 3 defa %25'lik (v/v) sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile 5 dakika süre ile

çalkalanan eksplantlar 4 defa steril saf su ile yıkanmış ve en son olarak 1 g/l steril Benlate® (Rhône Poulenc, France) solüsyonu ile 10 dakika muamele edilmişlerdir. Steril edilen eksplantlar 0.4 µM IBA ile kombine edilmiş 2.2, 4.4 ve 8.8 µM BA veya sadece 18.2 µM zeatin içeren OM ve DKW ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kùltürler 22±1°C'de 16 saatlik fotoperiyotta ve 80 µmol/m²s ışık şiddetinde tutulmuşlardır. İki ay sonunda elde edilen 2-3 cm uzunluğundaki sürgünler ya 5.4, 26.8 µM konsantrasyonlarda NAA, 4.1, 20.7 µM konsantrasyonlarda IBA içeren ½ DKW ortamlarında köklenme için kültüre alınmış ya da sürgünlerin bazal kısımları 2 veya 24 saat süresince 2.0 mM IBA solüsyonuna batırılarak büyüme düzenleyici içermeyen ½ DKW ortamına aktarılmıştır. Sürgün uzaması ve çoğaltımı için 4.4 µM BA ve 0.4 µM IBA ilave edilmiş DKW ortamı en iyi ortam olarak belirlenirken, 18.2 µM zeatin içeren OM ortamında yüksek dallanma elde edilmiştir. Köklenme için 20.7 µM IBA içeren ½ DKW ortamı uygun bulunmuştur.

Olea maderensis ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan *Olea maderensis*'in germplazm muhafazasını sağlamak amacı ile mikroçoğaltım için gerekli en iyi temel ortam bulunmaya çalışılmıştır. Denemelerde tarlada yetişen 30 yıllık ağaçlardan kışın alınan sürgünler kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra 1-2 nodlu eksplantlar 4 farklı besin ortamına yerleştirilmişlerdir: zeytin ortamı (OM) ve aynı ortamın FeNaEDTA, MgSO₄ ve MnSO₄ konsantrasyonlarının sırasıyla 2 (OMG), 4 (OMG4) ve 10 (OMG10) katına çıkarıldığı 3 modifiye OM ortamı kullanılmış ve bu ortamların her birine %3 (w/v) sukroz %0.7 (w/v) agar ilave edilmiştir. Kùltürler 22±1°C'de, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 45 µmol/ m²s ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Oluşan sürgünlerin her biri kendi ortamında alt kültüre alınmış ve ortamların hepsine 9.12 µmol/l zeatin eklenmiştir. Diğer ortamlarda eksiklikten (OM) veya elementlerin toksisitesinden (OMG4 ve OMG10) yaprak klorozu ya da nekrozu ve absisyonu gözlenirken, Fe, Mg ve Mn konsantrasyonların iki katına çıkarıldığı (OMG) besin ortamında daha canlı ve yeşil sürgün gelişimleri sağlanmıştır. OMG'de gelişen sürgünler ayrıca en yüksek uzama-çoğaltım oranı göstermişlerdir. OMG ve OM'de gelişen sürgünlerde fizyolojik analizler de gerçekleştirilmiştir. OMG'de gelişen sürgünlerde klorofil a ve b içerikleri ile floresan/ışınım değerleri (F_v, F_m) daha yüksek olarak belirlenmiştir. Fotosentez

için önemli olan Fe, Mg ve Mn konsantrasyonlarının iki katına çıkarılması yaprak canlılığını ve fotosentezi teşvik etmiştir. OMG'de gelişen ortamlarda daha yüksek Mg, Fe ve Mn içeriği belirlenmiştir. Arazide elde edilen yapraklarla kıyaslandığında *in vitro* da gelişen yaprakların daha yüksek protein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. En fazla köklenme (%85) OMG ortamında gelişen sürgünlerde elde edilmiştir ve bitkiler başarılı şekilde aklimatize edilmişlerdir (Brito and Santos, 2009).

Ali et al. (2009), Moraiolo çeşidi için en iyi mikroçoğaltım ortamını belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda zeatin ve BAP içeren WPM ve OM besin ortamlarını karşılaştırmışlardır. Eksplant kaynağı olarak 40 günlük periyotlarla 4 mg/l zeatin, 30 g/l sukroz, 6.5 g/l agar içeren OM besin ortamında altkültüre alınan *in vitro* sürgünler kullanılmıştır. 10-15 mm uzunluğundaki tek nodlu eksplantlar 30 g/l sukroz, 6.5 g/l agar ve farklı konsantrasyonlarda zeatin ve BAP içeren OM ve WPM besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 2000 lux ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. OM ortamı WPM ortamına göre morfolojik olarak daha iyi ve büyük mikrosürgünler vermiştir ve OM ortamı daha etkili bulunmuştur. Zeatin (3 mg/l)'in 0.5 mg/l BAP ile kombinasyonu sonucunda 2.25 cm uzunluk ve 1.88 adet nod sayısına sahip en yüksek sayıda mikrosürgün (eksplant başına 0.84 adet) elde edilmiştir.

Oueslati çeşidinde yapılan bir başka mikroçoğaltım çalışmasında, 50 yıllık ağaçlardan alınan tek nodlu eksplantlar steril edildikten sonra OM ortamına aktarılmışlar ve kültürler $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat aydınlık/8saat karanlık periyotta $45 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Kültürden 10 hafta sonra oluşan sürgünler (3.0-5.0 cm) aynı ortamda 2 defa 90 günlük periyotlarla altkültüre alınmışlardır. Sürgün çoğaltımı üzerine besin ortamlarının etkisini araştırmak amacı ile altkültürden elde edilen sürgünler 2 mg/l glisin, 200 mg/l glutamin ve 100 mg/l myo-inositol ve 0, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l zeatin içeren OM, MS ve yeni bulunan çoğaltma ortamı (multiplication medium, MM=1:1 OM ve MS makroelementlerinin kombinasyonu, OM mikroelementleri ve vitaminleri)'a transfer edilmişlerdir. En iyi sürgün gelişimi 1-2 mg/l zeatin içeren MM ortamında gözlenmiştir. Köklendirme için sürgünlerin dip kısımları 4-5 saniye

2000 ppm IBA solüsyonuna batırılmış daha sonra 1 mg/l IBA, 1 mg/l thiamin 30 g/l mannitol içeren ½MS ortamına aktarılmış ve yaklaşık %91 oranında köklenme elde edilmiştir. Aklimatize edilen bitkilerde %88 başarı elde edilmiştir (Chaari-Rkhis et al., 2011).

Lucchesini and Vitagliano (2002), Frantoio çeşidinde yaptıkları çalışmada köklendirme aşamasında değişik mikro çevreler oluşturarak bunların köklenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Köklendirme için 25 g/l mannitol, 0.5 mg/l NAA ve 160 mg/l putresin içeren kumlu ya da agarlı besin ortamı ve gaz geçirgen ve gaz geçirmeyen olmak üzere 2 tip kültür kapağı kullanılmış ve kültürler $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve $100\ \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Kapaktan havalandırma sağlanan kültür kaplarında her iki ortamda da (agarlı ve kumlu) sürgün gelişmesi havalandırma olmayan kültür kabındaki bitkilere göre daha iyi bulunmuştur. Agarlı ve havalandırılmalı kültür kaplarında ise kök gelişimi daha iyi olmuştur.

Marin-Zamaro et al. (2002), arbüsküler mikoriza (AM)'nin mikroçoğaltımı yapılan farklı zeytin çeşitleri (*Olea europaea* var. *oleaster* (yabani zeytin), Arbequina ve Blanqueta çeşitleri) üzerine etkilerini araştırmışlardır. Aklimatizasyon aşamasının başlangıcında bu çeşitler bazı AM fungusları (*Glomus mosseae* ve *G. intraradices*) ile inoküle edilmişler ve daha sonra gelişimleri gözlenmiştir. İnoküle edilmeyen kontrollerle karşılaştırıldığında, yabani zeytin ve Blanqueta çeşidinde AM inokülasyonunun bitki büyümesini arttırdığı, fakat Arbequina çeşidine etki etmediği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar mikorizal simbiyozisin bitki büyümesinde önemli bir artış sağladığını, ancak bu mikorizasyon prosesinin başarısının zeytin çeşidine, inokulum miktarına ve substrat gübrelemesine bağlı olduğunu göstermiştir.

Binet et al. (2007), mikroçoğaltımı yapılan Laragne çeşidinin mikrobikciklerini arbüsküler mikorizal fungus *G. mosseae* ile inoküle etmişler ve bitkilerin hayatta kalma oranını ve devamında da bitki büyüme ve gelişmesini artırdığını rapor etmişlerdir.

Büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra, zeytin eksplantlarının *in vitro* köklenmesi için ortam aydınlatması da önemli bir faktördür. Rugini ve ark. (1988, 1993)'nın yaptıkları çalışmada kültür kaplarının besin ortamını içeren dış yüzeyi siyaha boyanarak eksplantların bazal kısımlarında bir karartma sağlanmış ve katılaştırılmış besin ortamının yüzeyi siyah steril polikarbonat granülleri ile kaplanmış, bu şekilde köklendirme oranında önemli bir artış sağlanmıştır. Rugini'nin bu ilginç ama zahmetli tekniğinin yerine Mencuccini (2003) daha basit ve ekonomik bir yöntem geliştirmiştir. *In vivo*'da değişik köklenme kabiliyetine sahip Frantoio (yüksek köklenme, %50), Dolce Agogia (orta derecede köklenme, %30-50) ve Moraiolo (düşük köklenme, %30)'nun 3-4 cm uzunluğundaki 3 nodlu *in vitro* sürgünleri 5 μ M NAA, %2 sukroz ve %0.7 agar içeren MS besin ortamında köklendirme için kültüre alınmışlardır. Brilliant Black BN (SIGMA B8384; C.I. 28440) boyası 0, 10, 100 ve 200 mg/l konsantrasyonlarında köklendirme ortamına eklenmiştir. Diğer bir deneme de Rugini et al. (1993) tarafından geliştirilen ve yukarıda tarif edilen şekilde kurulmuş ve kontrol olarak ele alınmıştır. Aynı deneme, farklı zaman periyotlarında (Ocak, Mayıs ve Eylül) oluşturularak, köklenme yüzdesi, kök sayısı ve uzunluğu gözlenmiştir. Ocak ayında yapılan denemelerde karartma gerçekleştirilmeyen uygulamada %12-28, 10 mg/l boya eklenen uygulamada %45'den az, 100 ve 200 mg/l boya eklenen uygulamada Frantoio çeşidinde %100, Dolce Agogia ve Moraiolo çeşitlerinde %76-88 köklenme elde edilmiştir. Mayıs ayında kurulan denemelerde 100 ve 200 mg/l boya eklenen ve kontrol uygulamalarında, tüm çeşitlerde %80-100 oranında köklenme gerçekleşmiştir. Eylül ayında gerçekleştirilen denemelerde ise gerek karartılmış gerekse de karartılmamış ortamlarda tüm çeşitlerde en yüksek köklenme yüzdesi, kök sayısı ve kök uzunluğu elde edilmiştir.

Rostami and Shahsavar (2012), zeytinin en önemli çeşitlerinden biri olan Mission'da yaptıkları çalışmada, bu çeşidin mikroçoğaltımı için etkili bir prosedür ortaya koymaya çalışmışlardır. Mission bir Amerikan zeytin çeşidi olup, soğuğa, tuzluluğa ve zeytin dal kanseri hastalığına (*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*) dayanıklıdır. Ayrıca köklenmesi zayıftır ve üretim verimi oldukça düşüktür. Steril edilen eksplantlar 30 g/l sukroz, 8 g/l agar ve farklı konsantrasyonlarda BA (0, 0.7, 1.4, and 2.1 mg/l) ve giberellik asit (0, 0.7, 1.4, and 2.1 mg/l) içeren ½ MS ortamlarına aktarılmışlardır. Köklendirme için, gelişen sürgünler 0, 2.0, 4.0, and

6.0 mg/l $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmışlardır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 2.08 mg/l GA₃ ve 2.10 mg/l BA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Besin ortamında GA₃ ve BA konsantrasyonu arttıkça sürgünlerin uzunluğu ve yaprak oluşumu artmış ve en uzun eksplantlar (12.5 mm) ve maksimum yaprak sayısı (sürgün başına 1.26 adet) 2.08 mg/l GA₃ ve 2.10 mg/l BA içeren besin ortamında gözlenmiştir. En yüksek köklenme yüzdesi (%93) 6 mg/l IBA içeren besin ortamında rapor edilmiştir. Aklimatizasyonda %88 başarı sağlanmıştır.

Khan et al. (2002), Pantaloon çeşidinin meristem ucu kültürlerinde kullanmak üzere sterilizasyon için gerekli prosedürü saptamaya çalışmışlardır. Çalışmada tarlada yetişen 15 yıllık Pantaloon çeşidine ait ağaçlardan aktif büyüme aşamasında alınan apikal sürgünlerin öncelikle yaprakları uzaklaştırılmış ve 2-3 cm uzunluğundaki sürgünler 2-3 saat süresince akan suyun altında yıkanmışlardır. Yıkama işleminden sonra eksplantlar 30 dakika 100 mg/l askorbik asit ve 150 mg/l sitrik asit bulunan solüsyonda bekletilmişlerdir ve daha sonra farklı sterilizasyon prosedürleri denenmiştir. Birincisinde, sürgünler 15 dakika boyunca %100 Chlorox'da bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile durulanmışlar. İkinci olarak, eksplantlar öncelikle %70'lik etanole batırılmış ardından steril saf sudan geçirilerek %100 chlorox ile muamele edilmiş ve en son olarak 3 defa steril saf su ile çalkalanmışlardır. Üçüncüsünde, sürgünler 3 dakika süre ile 30 damla Tween-80 eklenmiş 677 mg/l HgCl₂ solüsyonuna batırılmış ardından steril saf sudan geçirilerek 15 dakika %50 chlorox ile muamele edilmiş ve sonunda 3 defa steril saf su ile çalkalanmışlardır. Dördüncü olarak bir önceki gibi sterilizasyon uygulanmış farklı olarak Tween-80 eklenmemiştir. Steril edilen eksplantlardan kesilen yaklaşık 0.5-0.8 mm boyutlarındaki sürgün uçları 0.5 mg/l 2 isopentenyladenine (2İP) veya 0.5 mg/l 2İP ile birlikte 150 mg/l cefotaxime içeren OM başlangıç ortamında kültüre alınmışlardır. Çalışma sonunda sterilizasyon için en uygun metodun 3. yöntem olduğu rapor edilmiş ve kültüre alınan eksplantlarda hem sürgün gelişimi hem de kallus oluşumu gözlenmiştir.

Grigoriadou et al. (2005) tarafından, *in vitro* çoğaltımı yapılan Chondrolia Chalkidikis çeşidinin mikro çeliklerinin sıvı kültürlerde çoğaltılması amacı ile yeni bir geçici daldırma sistemi (temporary immersion system=TIS) dizayn edilmiştir. Mikro çelikler 20 µmol zeatin, 10 µmol GA₃, 0.3 µmol NAA, %2 (w/v)

sukroz ve %0.5 (w/v) agar içeren WPM besin ortamında çoğaltılmışlardır. Eksplantlar aynı besin ortamında; yeni geliştirilen biyoreaktörde, katı ortamda (kontrol ortamı), sıvı ortamda başka bir biyoreaktör tipinde (LifeReactor®), erlenlerde çalkalanarak, filtre kağıdından yapılmış köprülerde tüplerde çoğaltılarak bu sistemler verim açısından değerlendirilmiştir. Kùltürler 23 ± 2 °C'de 16 saatlik fotoperiyotta ve $40 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Kùltürden 30 gün sonra yeni geliştirilen biyoreaktörden elde edilen sonuçlar (eksplant başına 1.93 yeni mikrosürgün, 0.95 cm sürgün uzunluğu) kontrol ortamı (eksplant başına 1.75 yeni mikrosürgün, 1.22 cm sürgün uzunluğu) ile elde edilen sonuçlar ile istatistiki açıdan aynı bulunmuştur. Ancak tüm sıvı kùltürlerde hiperhidrisite gözlenmiştir. Hiperhidrisiteyi azaltmak için TIS biyoreaktörü agarla katılaştırılmış besin ortamı kùltürleri ile kombine edilmiştir fakat bu sistemde sürgün çoğaltımı azalmıştır.

Özden vd. (2010), Edremit yağlık çeşidine ait zeytin fidanlarından aldıkları nodal eksplantları farklı miktarlarda (10-30 g/l) değişik karbon kaynakları (sukroz, mannitol ve glukoz), bitki büyüme düzenleyicileri (20 μM zeatin tek başına veya 5 veya 10 μM zeatin 66 μM dikegulak ile birlikte) ve 50 mg/l FeEDDHA içeren hem yarı katı hem de geçici daldırma biyoreaktörlerindeki (RITA) sıvı Olive Medium besin ortamlarında kùltüre almışlardır. RITA biyoreaktörlerinin daldırma periyodu 16 saatte bir 16 dakika olarak ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, nodal eksplantlardan en fazla sürgün rejenerasyonu mannitol, zeatinle birlikte dikegulak içeren sıvı besin ortamında biyoreaktör sistemlerinde meydana gelmiştir.

In vitro çoğaltım aşamasında veya köklendirme aşamasında sürgünlerin desikasyona uğraması, yapraklarını dökmesi ve *in vitro* köklenmenin düşük olması nedeni ile Arbequina çeşidinin *in vitro* kùltürü zordur. Daha canlı sürgünler elde etmek amacı ile bu çeşitte mikroaşılama yapılmıştır. Sera koşullarında yetiştirilen 12 yıllık olgun ağacın yeni sürgünlerinden 1.0-1.5 cm uzunluğunda, apikal ve subapikal tomurcuklara sahip terminal sürgünü aşısı olarak kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra, bu eksplantın yaprakları tamamen kesilmiş ve bazal kısmı “v” şeklinde kesilmiştir. Çöğür kısmı için olgun dokular yerine genç sürgünler kullanılmıştır. Bunun için izole edilen embriyolar *in vitro*

koşullarda çimlendirilerek nod kültürü ile çoğaltılmışlardır. Elde edilen sürgünleri bazal kısımları yine 0.5 cm uzunluğunda aşının tam oturtulabileceği şekilde kesilmiştir. Çöğür kısmından her hangi bir sürgün gelişimini engellemek için çöğür üzerindeki tomurcuklar dikkatli bir şekilde temizlenmiştir. Aşı ve çöğürün kaynaşmasını sağlamak için parçalar silikon maşa ile tutturulmuştur. Bu şekilde hazırlanan mikroaşılar 4.4 μM BA ve 0.05 μM IBA içeren DKW besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgünler 2-3 nodlu 2 cm uzunluğa eriştiğinde 0.5 μM IBA ve %2 sukroz içeren ve vitamin ve aminoasit bulunmayan $\frac{1}{2}$ DKW ortamında kültüre alınmış, 1 hafta karanlıkta bırakıldıktan sonra ışıklı ortama alınmışlardır. Mikroaşılama yapılan bitkilerin canlı kalma oranı oldukça yüksek olmuştur ve istenilen canlı sürgünler elde edilebilmiştir (Revilla et al., 1996).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Ocak-Haziran 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.1.1 Materyal

Çalışmada materyal olarak çelikle üretimi kolay bir çeşit olan Gemlik, çelikle üretimi zor olan ve aşıyla üretilen Domat çeşidi kullanılmıştır. Bu dönemde gerçekleştirilen çalışmalar için kullanılan zeytin materyali Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait serada kontrollü koşullar altında tutulan 5 yıllık fidanlardan temin edilmiştir (Şekil 3.1). Gemlik ve Domat zeytin çeşitlerinden tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve bazen 6. nodları kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1 2009 yılı Nisan-Mayıs aylarında kurulan denemeler için kullanılan ve Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait seralarda bulunan fidanların görünümü



Şekil 3.2 Eksplant olarak kullanılan tek yıllık (a) Domat çeşidi sürgünleri (b) Gemlik çeşidi sürgünleri

3.1.2 Metot

3.1.2.1 Eksplantların sterilizasyonu ve kültüre alınması

Bu dönemde alınan materyallerin sterilizasyonu için daha önce Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Laboratuvarı'nda zeytinle ilgili yapılan bir çalışmadan elde edilen en uygun prosedür kullanılmıştır (Gürel vd., 2006). Farklı olarak materyaller, Askorbik asit'te 10 dk yerine bir gün bekletilmiştir. Seradan alınan tek yıllık yeni sürgünlerin öncelikle yaprakları uzaklaştırılmış ve geriye kalan gövde kısmı 1 nod içerecek şekilde 1.5-2 cm'lik parçalara ayrılmıştır. Elde edilen nodal eksplantlar, üzerlerindeki büyük kontaminant partiküllerin giderilmesi ve eksplant tarafından salgılanan fenoliklerin uzaklaştırılması amacıyla 1 saat süreyle akan suyun altında bekletilmişlerdir. Daha sonra eksplantlar kültürde meydana gelebilecek kararmaları önlemek için 100 mg/l Askorbik asit içerisinde 1 gün süreyle bekletilmişlerdir. Ertesi gün daha önceden UV ile steril edilmiş ve alkolle silinmiş steril kabin içerisinde eksplantlar, önce %70'lik etil alkol içine birkaç saniye daldırılmış, daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi (NaOCl) (Merck-aktif klor içeriği %10 olan) içerisinde 10 dakika çalkalanmışlardır. En son olarak üzerindeki sterilit maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır (Şekil 3.3).

Sterilizasyonu yapılan materyaller, daha önceden hazırlanıp kültür tüplerine paylaştırılan ortamlarda kültüre alınmışlardır (Şekil 3.3). Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.3 Eksplantların sterilizasyonu ve kültüre alınması

3.1.2.2 Besin ortamlarının hazırlanması

Bu dönemde her iki çeşide ait sterilizasyonu yapılmış nod eksplantlarının kültüründe 0, 1.0, 2.0 mg/l konsantrasyonlarında Zeatin (ZEA), 6-Benzyladenin (BA), Kinetin (KİN) içeren OM_b (Olive Medium Başlangıç) (Rugini, 1984) ortamı ve Modifiye DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2).

Nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan yarı katı besin ortamlarını hazırlarken, ilk olarak önceden yapılmış stok çözeltilerden 1 litre için gerekli olan miktarlar alınarak behere aktarılmıştır. Ardından ortama tartılarak konulması gereken bileşikler ve karbon kaynağı (OM_b için 20 g/l mannitol, DKW için 30 g/l sukroz) eklenip, gerekli miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir ve en son olarak hacim destile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Katı bileşikler iyice çözüldükten sonra seyreltilmiş NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidrojen klorür) kullanılarak pH=5,8'e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar) ilave edildikten sonra devamlı karıştırılarak berraklaşınca kadar kaynatılmış ve sıcak olarak cam tüplere (23/24x140 mm) her birine 10 ml olacak şekilde dökülmüştür. Ağzıları kapatılan kültür tüpleri, otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir.

Araştırmada kullanılan diğer besin ortamlarının hazırlanmasında da aynı işlemler uygulanmıştır. Farklı olarak zeatin gibi ısı ile bozulan maddeler besin ortamlarına eklenmek istendiğinde, bu maddeler istenilen miktarda çözelti haline getirilerek filtre sterilizasyonundan geçirilmiş ve besin ortamlarına eklenmişlerdir. Isı ile bozulan maddeler ilave edilmeden önce diğer tüm bileşikler eklenerek besin ortamı ve ortamın döküleceği kültür tüpleri steril edilmiş, ardından laminar hava akışlı kabin içerisinde besin ortamının sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye düştükten sonra ilave edilmek istenilen maddenin solüsyonu filtreden geçirilerek ortama eklenmiştir.

Çizelge 3.1 Tüm çalışmalar süresince kullanılan temel besin ortamları

Bileşikler	Kültür ortamlarındaki bileşiklerin konsantrasyonları (mg/l)				
	MS	WPM	OM _b	OM _s	Modifiye DKW*
KNO ₃	1900	-	500	1100	-
K ₂ SO ₄	-	999	-	-	1559
NH ₄ NO ₃	1650	400	100	412	1416
MgSO ₄	-	180.7	-	-	361.49
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	-	250	1500	-
CaCl ₂	-	72.2	-	-	112.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-	40	440	-
Ca(NO ₃) ₂	-	386	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	-	-	-	-	1664.64
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	600	-
KH ₂ PO ₄	170	170	50	340	265
MnSO ₄ .H ₂ O	-	22.3	-	-	33.8
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	-	5.6	22.3	-
KCl	-	-	-	500	-
KI	0.83	-	0.2	0.83	-
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	1.5	12.4	4.8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	2.1	14.3	18.13
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25	0.006	0.25	0.25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.6	0.25	0.39
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-	0.006	0.025	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.9	13.9	27.8	27.80
Tritriplex(Na ₂ EDTA)	37.3	37.3	18.4	37.5	41.50
Nikotinik asit	0.5	0.5	0.25	5.0	1.0
Pridoksin-HCl	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5*
Thiamin-HCl	0.1	1.0	10	0.5	2.0
Biotin	-	-	-	0.05	-
Folik asit	-	-	-	0.5	0.5*
Cystine	-	-	-	-	10.0*
myo-inositol	100	100	50	100	100
Glisin	2.0	-	1.0	2.0	2.0
Glutamin	-	-	-	2190	1200*
Sukroz	30000	30000	-	-	-
Mannitol	-	-	20000	30000	30000

*Roussos and Pontikis (2002)'in zeytin için modifiye ettiği DKW ortamındaki miktarları ifade etmektedir

Çizelge 3.2 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları

	Besin ortamları	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarı (mg/l)
1	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	-
2	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l BA
3	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l BA
4	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l KİN
5	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l KİN
6	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l ZEA
7	OM _b	20 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l ZEA
8	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	-
9	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l BA
10	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l BA
11	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l KİN
12	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l KİN
13	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l ZEA
14	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l ZEA

3.2 Temmuz-Aralık 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.2.1 Materyal

Materyal olarak sadece serada kontrollü koşullarda yetişen fidanlardan alınan eksplantlar değil, bahçedeki yetişkin ağaçlardan alınan eksplantlar da kullanılmıştır ve bu materyaller Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan temin edilmiştir. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması Ekim, Kasım ve Aralık aylarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan denemelerden elde edilen *in vitro* sürgünler sürgün geliştirme ortamını belirlemek amacıyla eksplant olarak kullanılmışlardır.

3.2.2 Metot

Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan denemelerden elde edilen steril *in vitro* sürgünler altkültüre alınmıştır. Ayrıca bu dönemde kurulan kültürlerde özellikle Domat çeşidinde kontaminasyon problemi ile karşılaşıldığından, Gemlik ve Domat çeşitlerine ait hem fidanlar hem de bahçedeki ağaçlar için uygun sterilizasyon yöntemlerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

3.2.2.1 Sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalar

Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan çalışmalardan elde edilen *in vitro* sürgünler, sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacı ile 0, 1.0, 2.0 mg/l dozlarında BA, KİN ve ZEA içeren OM_s (Olive Medium-Zeytin Sürgün Geliştirme Ortamı) (Rugini, 1984) ve modifiye DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) besin ortamlarında altkültüre alınmıştır. Besin ortamlarının içerikleri Çizelge 3.3’de belirtilmiştir. Kullanılan temel besin ortamlarının içerikleri ise Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca besin ortamlarının hazırlığı “3.1.2.2” altbaşlığında anlatılmıştır.

Yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda ve 6 yapraklı sürgünler bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek yukarıda bahsedilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültürler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Denemeler, üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için Gemlik çeşidinde 10 eksplant, Domat çeşidinde ise 5 eksplant kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 Sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri

	Besin ortamları	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarı (mg/l)
1	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	-
2	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l BA
3	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l BA
4	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l KİN
5	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l KİN
6	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l ZEA
7	OM _s	30 g/l Mannitol	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l ZEA
8	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	-
9	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l BA
10	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l BA
11	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l KİN
12	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l KİN
13	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	1 mg/l ZEA
14	DKW	30 g/l Sukroz	7 g/l Agar Powder (Alfa Aesar)	2 mg/l ZEA

3.2.2.2 Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidan ve ağaçlardan alınan eksplantlar için uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Serada muhafaza edilen fidanlardan alınan eksplantlar ile bahçede yetişen ağaçlardan alınan eksplantlara farklı sterilizasyon uygulamaları yapılmıştır. Sterilizasyonun ön aşaması; hem seradan alınan materyaller, hem de bahçeden alınan materyaller için aynı yapılmıştır. Fidanlardan ve ağaçlardan alınan tek yıllık yeni sürgünlerin öncelikle yaprakları uzaklaştırılmış ve geriye kalan gövde kısmı nod içerecek şekilde 1-2 cm'lik parçalara ayrılmıştır. Elde edilen nodal eksplantlar, üzerlerindeki büyük kontaminant partiküllerin giderilmesi amacıyla 3-4 damla detarjan damlatılmış suyla 5 dakika çalkalanmışlardır. Daha sonra eksplant tarafından salgılanan fenoliklerin uzaklaştırılması için materyaller 1 saat süreyle akan suyun altında bekletilmişlerdir. Bundan sonraki aşamalar fidan ve ağaçlar için farklı uygulanmıştır.

3.2.2.2.1 Serada muhafaza edilen fidanlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlar için uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan alınan nodal eksplantlar ön sterilizasyon işleminden sonra, kültürde meydana gelebilecek kararmaları önlemek amacıyla 100 mg/l Askorbik asit içerisinde yarım saat süreyle bekletilmişlerdir. Sterilizasyon için eksplantlar önce %70'lik etil alkol içinde 30 saniye tutulmuş ve ardından birkaç damla Tween-20 eklenmiş %10 ve %15'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) (Merck, aktif klor içeriği %10 olan) içerisinde 10 dakika süre ile çalkalanmışlardır. En son olarak üzerlerindeki sterilant maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır. Steril edilen nodal eksplantlar OM_b ortamında kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 25 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Domat çeşidinde fidanlardan alınan nodal eksplantlarda steril eksplant yüzdesi yukarıdaki uygulamalar sonucunda düşük bulunduğu ve kararan ekplant sayısı fazla olduğu için, seradan alınan eksplantlara başka bir sterilizasyon uygulaması yapılmıştır. Buna göre, eksplantlar ön sterilizasyon işleminden geçirildikten sonra, 3 g/L fungusit (CAPTAN-etkili madde miktarı %50 Captan) solüsyonunda 1 gün bırakılmış ve ertesi gün steril kabin içerisinde öncelikle %70'lik etil alkolde 30 sn bekletilmiş ve daha sonra farklı NaOCl solüsyonlarında (%10 ve %7,5) ve farklı süreler (7,5 dakika ve 10 dakika) kullanılarak steril edilmişlerdir. En son olarak eksplantlar üç kez steril saf su ile çalkalanmışlardır. Sterilizasyondan sonra, nodal eksplantlar OM_b ortamında kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Tüm kültürler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2.2.2 Bahçedeki ağaçlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlar için uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Bahçede bulunan ağaçlar, dış koşullarla doğrudan temas halinde olduklarından her türlü kontaminasyona açık konumdadırlar. Bu yüzden ağaçtan alınan eksplantlara sterilizasyon, daha farklı ve serada yetişen fidanlara göre daha ağır uygulanmıştır. Ön sterilizasyon aşaması daha önce anlatıldığı gibi yapılmıştır. Ön sterilizasyondan sonra üç farklı sterilizasyon denenmiştir (Çizelge 3.4).

1. İlkinde, nodal eksplantlar steril kabin içerisinde öncelikle %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilmiş, daha sonra %15'lik NaOCl'de 10dk, 15dk ve 20dk süreler ile çalkalanmışlardır.
2. İkincisinde, ön sterilizasyondan sonra nodal eksplantlar 1 saat 3g/l fungusit (CAPTAN) içeren solüsyona maruz bırakılmış ve daha sonra, steril kabin içerisinde önce %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilmiş, ardından %15'lik NaOCl'de 10dk, 15dk ve 20dk süreler ile çalkalanmışlardır.
3. Üçüncüsünde, ön sterilizasyondan sonra, eksplantlar 1 gün 3 g/l fungusit (CAPTAN) içeren solüsyonda tutulmuş ve steril kabin içerisinde önce %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilmiş, daha sonra %15'lik NaOCl'de 10dk, 15dk ve 20dk süreler ile çalkalanmışlardır. Eksplantlar en son olarak üzerindeki sterilant maddeler uzaklaşmaya kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır.

Sterilizasyondan sonra nodal eksplantlar, OM_b ortamında kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak kurulmuştur. Kültürler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.4 Bahçedeki ağaçlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Uygulama	Fungusit (3 g/l) ön uygulama süresi	NaOCl konsantrasyonu	NaOCl uygulama süreleri
1	-	%15	10 dk
2	-	%15	15 dk
3	-	%15	20 dk
4	1 saat	%15	10 dk
5	1 saat	%15	15 dk
6	1 saat	%15	20 dk
7	1 gün	%15	10 dk
8	1 gün	%15	15 dk
9	1 gün	%15	20 dk

3.3 Ocak-Haziran 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.3.1 Materyal

Temmuz-Aralık 2009 döneminde yapılan çalışmalardan elde edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait *in vitro* sürgünler bu dönemde yapılan çalışmalar için materyal olarak kullanılmıştır.

3.3.2 Metot

Ocak-Haziran 2009 döneminde elde edilen sürgünlerin, sürgün geliştirme ortamını belirlemek amacıyla aktarıldıkları besin ortamlarında klorozis, nekrozis ve absisyona uğramaları, bu durumun besin elementi eksikliğinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, Temmuz-Aralık 2009 döneminde yapılan çalışmalardan elde edilen Gemlik çeşidine ait *in vitro* bitkicikler; 2 mg/l ZEA içeren OMs ortamında (1. Ortam), Britos ve Santos (2009)'un kullandığı konsantrasyonu iki katına çıkarılmış Fe, Mg ve Mn ve 2mg/l ZEA içeren Oms ortamında (2. Ortam) ve boy artışını teşvik etmek amacı ile KNO₃ konsantrasyonu arttırılmış (5 mg/l) OMs ortamında altkültüre alınmışlardır (3. Ortam). Her bir tekerrür için 10 sürgün kullanılmış ve denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Ancak, zeatinli ortamın hazırlanması sırasında ortamda

meydana gelen kontaminasyondan dolayı çok az materyal elde kalmıştır. Kontaminasyonsuz olan eksplantlarda en iyi gelişim potasyumu arttırılmış Oms ortamında gözlenmiştir. Geriye kalan mevcut Gemlik sürgünlerinden bir kısmı bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek sadece sürgünü içerecek şekilde bir kısmı da kesilmeden bağlı bulundukları ana dokuyu da içerecek şekilde 3. ortamda kültüre alınmışlardır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her bir tekerrür için 10 eksplant kullanılmıştır.

Domat çeşidinde Temmuz-Aralık 2009 döneminde elde edilen, iyi gelişme gösteren 18 eksplattan alınan sürgün uçları (0.7-1.0 cm) bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek 3. ortamda kültüre alınmışlardır. Denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 6 eksplant kullanılmıştır.

Tüm kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.4 Temmuz-Aralık 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.4.1 Materyal

Bu dönemde, zeytin güvesinin serada muhafaza edilen zeytin fidanlarına zarar vermesinden dolayı, fidanlardan deneme kurulamamıştır (Şekil 3.4). Zeytin fidanları yerine dış koşullarda yetişen olgun ağaçlardan alınan eksplantlardan Gemlik ve Domat çeşitleri için sterilizasyon protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır. Materyaller, Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait bahçeden temin edilmiştir. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması 2010 Kasım ve Aralık aylarında gerçekleştirilmiştir.

3.4.2 Metot

Bahçede bulunan Gemlik ve Domat ağaçlarından alınan nodal eksplantlara aşağıdaki sterilizasyon uygulamaları yapılmıştır (Çizelge 3.5).

1. Ağaçlardan alınan tek yıllık yeni sürgünler yaprakları kesilmeden akan suyun altında yıkanmış ve 1 gün 3 g/l fungusit (1.5 g/l CAPTAN-etkili

madde miktarı %50 CAPTAN ve 1.5 g/l BENOLEX- etkili madde miktarı %50 BENOMYL) içeren solüsyonda bekletilmişlerdir. Ertesi gün yaprakları uzaklaştırılarak gövde kısmı nod içerecek şekilde 1-2 cm'lik parçalara ayrılan eksplantlar 3-4 damla detarjan damlatılmış suyla 5 dakika süreyle çalkalanmışlardır. Daha sonra akan suyun altında 1 saat yıkanarak 100 mg/l Askorbik asit içeren solüsyonda yarım saat bekletilmişlerdir. En son, %70'lik etil alkolde 30 saniye çalkalanan nodal eksplantlar, %10'luk NaOCl ile 10dk, 15dk süreler ile steril edilmişler ve üzerlerindeki sterilant maddeler uzaklaşınca kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır.

2. 1. Uygulamayla aynı prosedür izlenmiş farklı olarak NaOCl'nin pH'ı 7'ye ayarlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (George, 1993). NaOCl bazik olduğundan hidroklorik asit (HCl) ile pH'ı düşürülerek 7'ye ayarlanmıştır. İşlem, ortaya çıkabilecek kimyasal reaksiyondan zarar görmemek için çeker ocakta yapılmış ve laminar hava akışlı kabinde sterilizasyon sırasında maske ve eldiven kullanılmıştır.
3. Fungusit ön uygulaması yapılmadan eksplantlar, pH'ı 7'ye ayarlanmış %10'luk NaOCl ile 10, 15 dakika steril edilmişlerdir. Sterilizasyondan sonra steril saf su ile eksplantlar durulanarak, steril fungusitli suya (1 mg/l BENOLEX) aktarılmışlar ve tekrar durulama olmadan kültüre alınmışlardır.
4. Ağaçlardan alınan tek yıllık yeni sürgünler, fungusitli solüsyonda bekletilmeden doğrudan yaprakları kesilerek her biri tek nod içeren 1-2 cm'lik parçalara ayrılmışlardır. Nodal eksplantlar beş dakika deterjanlı su ile yıkandıktan sonra, 1 saat akan suyun altında ve ardından 100 mg/l Askorbik asit içeren solüsyonda yarım saat bekletilmişlerdir. Sterilizasyon için, eksplantlar öncelikle %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilmiş, daha sonra %10'luk NaOCl ile 15 dk süreyle muamele edilmişlerdir. En son olarak da eksplantlar steril saf sudan geçirilmişlerdir. Bu uygulamada farklı olarak besin ortamlarına 1, 2, 3 ml/l konsantrasyonlarda Plant Preservative Mixture (PPM) ilave edilmiştir.

5. Uygulama 4'den farklı olarak eksplantlar 1 gün 3 g/l fungusit (1.5 g/l CAPTAN ve 1.5 g/l BENOLEX) içeren solüsyonda bekletilmiş, daha sonra aynı sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır.

Sterilizasyon işleminden sonra eksplantlar, OM_b ortamında kültüre alınmışlardır. Farklı olarak uygulama 4 ve 5 de besin ortamlarına 1, 2 veya 3 ml/l dozlarında ppm ilave edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda PPM ilave edilen besin ortamları 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak kurulmuştur. Tüm kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.4 Zeytin güvesinin fidanlarda yol açtığı zararlar

Çizelge 3.5. Bahçedeki ağaçlardan alınan Gemlik ve Domat çeşitlerine ait eksplantlar için uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Uygulama	Fungusit ön uygulama süresi (1.5 g/l CAPTAN + 1.5 g/l BENOLEX)	%70'lik etil alkol uygulama süresi	NaOCl uygulaması (konsantrasyon ve süre)	Fungusit son uygulaması (mg/l)	ppm uygulaması (ml/l)
1	24 saat	30 sn	%10- 10 dk	-	-
2	24 saat	30sn	%10-15 dk	-	-
3	24 saat	30sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-10 dk	-	-
4	24 saat	30 sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-15 dk	-	-
5	24 saat	30 sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-20 dk	-	-
6	-	30 sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-10 dk	1 mg/l BENOLEX	-
7	-	30 sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-15 dk	1 mg/l BENOLEX	-
8	-	30 sn	pH'ı 7'ye ayarlanmış %10-20 dk	1 mg/l BENOLEX	-
9	-	30 sn	%10-15 dk	-	1 ml/l
10	-	30 sn	%10-15 dk	-	2 ml/l
11	-	30 sn	%10-15 dk	-	3 ml/l
12	24 saat	30 sn	%10-15 dk	-	1 ml/l
13	24 saat	30 sn	%10-15 dk	-	2 ml/l
14	24 saat	30 sn	%10-15 dk	-	3 ml/l

3.5 Ocak-Haziran 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.5.1 Materyal

Temmuz-Aralık 2010 döneminde zeytin güvesinin sebep olduğu zararlardan dolayı, fidanlar kullanılamayacak hale gelmiştir. Ayrıca ağaçlar için yapılan sterilizasyon denemelerinde sterilizasyon başarısı arttırılmasına rağmen, nodal eksplantların hemen hemen hepsi kararmış ve denemelerin kurulması için uygun materyal sağlanamamıştır. Bu nedenle, 2011 yılı Mart Ayı içerisinde Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan yeni fidanlar (2 yıllık Gemlik fidanları ve 5 yıllık Domat fidanları) temin edilmiş ve poşetlerde bulunan fidanlar saksılara aktarılmışlardır (Şekil 3.5). Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ait serada muhafaza edilen fidanlara her hafta düzenli olarak püskürtme şeklinde fungusit (3 g/l BENOLEX) ve 1,5 g/l 20:20:20 NPK gübresi uygulanmıştır. Haziran Ayı başında Gemlik ve Domat zeytin çeşitlerine ait fidanlardaki yeni sürgünler kültüre alınabilecek duruma gelmiş, nod ve meristem kültürü denemeleri kurulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.5 Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan temin edilen ve Biyomühendislik Bölümü'ne ait serada muhafaza edilen yeni fidanlar

3.5.2 Metot

3.5.2.1 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin kurulması

Bu dönemde çalışmalara yeni alınan fidanlarla devam edileceğinden, öncelikle iki çeşit için uygun temel besin ortamlarının belirlenmesine çalışılmıştır. Temel besin ortamlarını karşılaştırmak amacıyla; 1) OM_b (Zeytin Başlangıç Ortamı) (Rugini, 1984), 2) modifiye DKW (Driver and Kuniyuki, 1984), 3) Oms (Zeytin Sürgün Geliştirme Ortamı) (Rugini, 1984), 4) WPM (Lloyd ve McCown, 1980) ve 5) modifiye Oms ortamı (içeriğindeki Fe, Mg ve Mn konsantrasyonları iki katına çıkarılmış) (Brito ve Santos, 2009) kullanılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan temel besin ortamları

	Besin ortamları	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)
1	OM _b	20 g/l Mannitol	6.5 g/l Agar (Fluka)
2	DKW	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Agar (Fluka)
3	OM _s	30 g/l Mannitol	6.5 g/l Agar (Fluka)
4	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Agar (Fluka)
5	Modifiye OM _s	30 g/l Mannitol	6.5 g/l Agar (Fluka)

Gemlik ve Domat çeşitlerinde nod kültürlerini kurmak amacı ile 2011 yılı Haziran ayı başında yeni çıkan sürgünlerden (henüz odunsulaşmamış taze sürgünler) alınan 1.5-2 cm uzunluğundaki nodal eksplantlar öncelikle %70'lik etil alkole birkaç saniye daldırılmış, daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş %15'lik sodyum hipoklorit (Merck) (aktif klor içeriği %10 olan) içerisinde 10 dakika süreyle çalkalanmışlardır. En son olarak üzerindeki sterilant maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır. Nodal eksplantlar sterilizasyondan sonra Çizelge 3.6'de gösterilen beş temel besin ortamında tüplerde kültüre alınmışlardır.

Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kùltürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lùks ışıık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

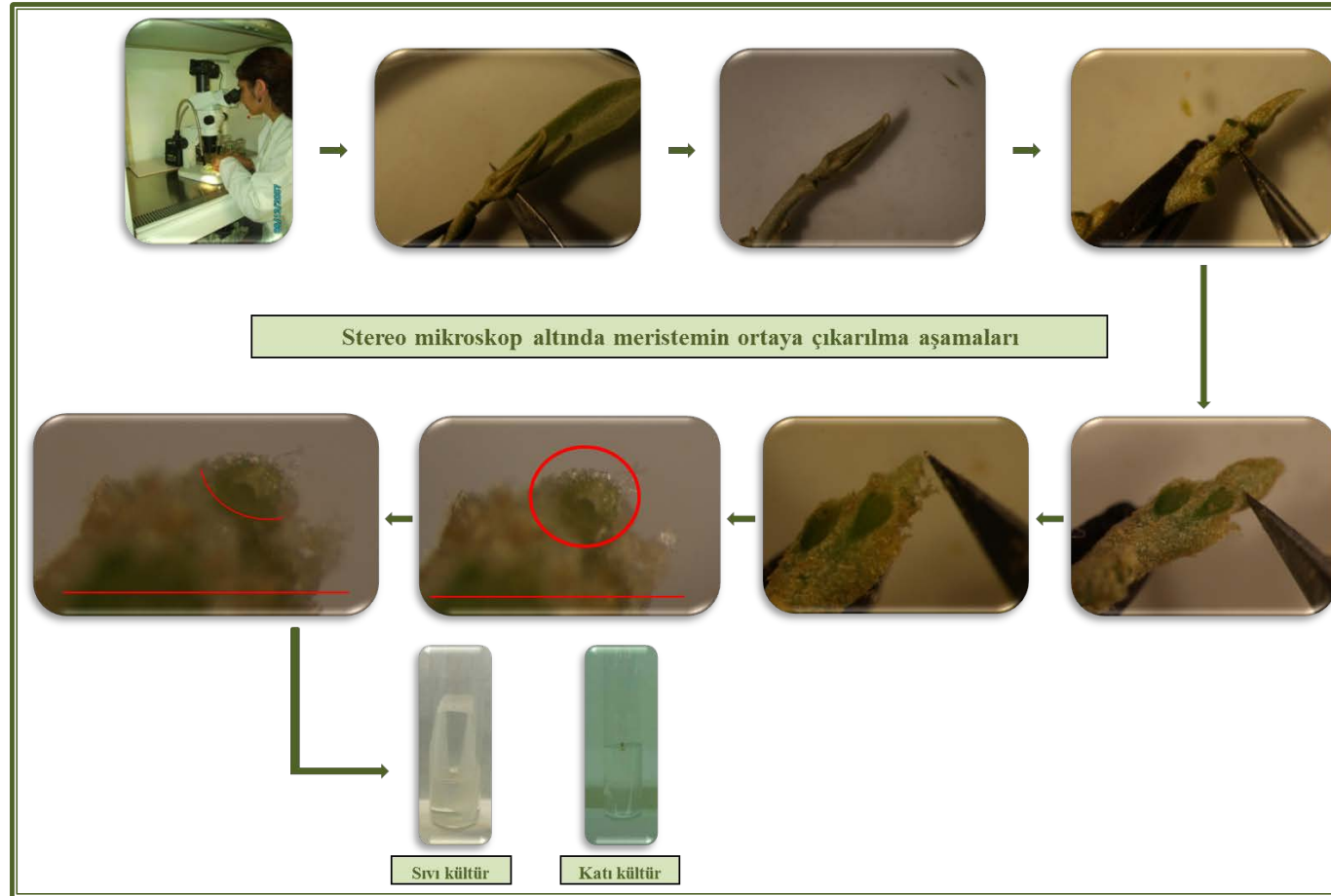
3.5.2.2 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kùltürlerinin kurulması

Gemlik ve Domat çeşitlerinde meristem kùltürleri fidanlara ait yeni çıkan tek yıllık sürgünler kullanılarak oluşturulmuş ve 2-3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının yaprakları uzaklaştırılarak sterilizasyon nod kùltürlerinde olduğu gibi yapılmıştır. Besin ortamı olarak 20 g/l mannitol ve 6.5 g/l agar (Fluka) içeren OM_b ortamı kullanılmıştır.

Meristemlerin izolasyonu ve kùltüre alınması

Laminer hava akışlı kabin içersine alınan stereo mikroskop tablasına daha önceden steril edilen petri kabı yerleştirilmiş ve meristem ucu alınacak 2-3 cm uzunluğundaki steril sürgün uçları bu petriye konulmuştur. Zeytin sürgünündeki yapraklar stereo mikroskop altında dıştan içe doğru kesilmiştir (Şekil 3.6). En son olarak iki yaprak taslağı içeren meristem (yaklaşık 300-350 µm boyutlarında), keskin ince uçlu bisturi yardımıyla dikkatlice kesilmiştir. Kesilen meristem ucu yine aynı alet kullanılarak yarı katı OM_b ortamında kùltüre alınmıştır.

Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kùltürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lùks ışıık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.6 Meristemin stereo mikroskop altında izolasyonu ve kültüre alınması (bar=1 cm)

3.6 Temmuz-Aralık 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.6.1 Materyal

Gemlik ve Domat zeytin çeşitlerinde yeni fidanlardan alınan tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanılarak nod kültürü denemeleri ve sürgün uçları kullanılarak meristem kültürü denemeleri oluşturulmuştur. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması 2011 yılı Ekim, Kasım ve Aralık aylarında gerçekleştirilmiştir.

3.6.2 Metot

3.6.2.1 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin kurulması

1.5-2 cm uzunluğundaki nodal eksplantlar öncelikle %70'lik etil alkol içerisinde birkaç saniye daldırılmış, daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş %15'lik sodyum hipoklorit (Merck) (aktif klor içeriği %10 olan) içerisinde 10 dakika süreyle çalkalanmışlardır. Son olarak da eksplantlar üzerindeki sterilit maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır.

Sterilizasyonu yapılan materyaller, daha önceden hazırlanıp kültür tüplerine paylaştırılan 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l konsantrasyonlarında ZEA, 30 g/l sukroz ve 6.5 g/l Plant agar (Duchefa) içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.7). Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.7 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları

	Besin ortamı	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarı (mg/l)
1	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	-
2	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	0.5 mg/l ZEA
3	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	1.0 mg/l ZEA
4	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	2.0 mg/l ZEA
5	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	4.0 mg/l ZEA

3.6.2.2 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kültürlerinin kurulması

Gemlik ve Domat çeşitlerinin her ikisi için hem yarı katı, hem de sıvı OM_b ve WPM besin ortamlarında meristem kültürü denemeleri yapılmıştır. Materyal olarak fidanların aktif büyüme zamanlarında alınan 2 cm uzunluğundaki sürgün uçları kullanılmıştır. Sterilizasyon nod kültürlerinde uygulandığı gibi yapılmıştır. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.6.2.3 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar

Domat çeşidinde eksplantlarda meydana gelen kararmaları azaltmak amacıyla nod kültürlerinde aşağıda belirtilen uygulamalar yapılmıştır:

- **Uygulama 1:** NaOCl solüsyonunun uygulanma süresinde değişiklik yapılmıştır. %15’lik sodyum hipoklorit (Merck) (aktif klor içeriği %10 olan) solüsyonuyla yapılan sterilizasyonun süresi 15 dakikadan 10 dakikaya indirilmiştir.

- **Uygulama 2:** Sterilant madde değiştirilerek NaOCl yerine civa klorür (HgCl_2) kullanılmıştır. Eksplantlar, %0.1'lik HgCl_2 solüsyonunda 5 dakika süre ile steril edilmişlerdir.
- **Uygulama 3:** Eksplantlar %0.1'lik HgCl_2 solüsyonunda 10 dakika süre ile steril edilmişlerdir.
- **Uygulama 4:** Sterilant madde olarak anolit kullanılmıştır. Anolit seyreltilmeden saf olarak 30 dakika süreyle eksplantlara uygulanmış ve eksplantlar steril saf su ile durulanmadan kültüre alınmışlardır.
- **Uygulama 5:** Eksplantlar 60 dakika süreyle anolit ile steril edilmiş ve durulanmadan kültüre alınmışlardır.
- **Uygulama 6:** %10'luk NaOCl solüsyonu ile 15 dakika çalkalanan eksplantlar steril saf su ile durulandıktan sonra yine steril saf suda 3 saat süre ile bekletilmişlerdir. Besin ortamlarına aktarılan eksplantlar önce bir hafta süreyle sürekli karanlıkta muhafaza edilmişler ve daha sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoda alınmışlardır (Seyhan ve Özzambak, 1994).
- **Uygulama 7:** Eksplantlar sterilizasyondan önce 100 mg/l askorbik asitte 2 saat süre ile bekletildikten ve %10'luk NaOCl solüsyonunda 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kültüre alınmışlardır. Kültürler öncelikle 7 gün sürekli karanlıkta muhafaza edilmiş, daha sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoda alınmışlardır.

Steril edilen nodal eksplantlar 30 g/l sukroz, 0.5 mg/l BA ve 6.5 g/l Plant agar içeren WPM besin ortamında kültüre alınmışlardır. Tüm denemeler, üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir deneme için 15 eksplant kullanılmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.6.2.3 Domat çeşidinde kallus kültürünün kurulması

Zeatin içeren ortamlarda eksplantlar tamamen kararmalarına rağmen, bazı eksplantların bazal kısımlarında yeşil kallus oluşumları gözlenmiştir. Bu yüzden, bu çeşitte kararma sorununun çözümüne yönelik çalışmalar, nod ve meristem kültürü denemelerine devam edilmesinin yanı sıra, kallus oluşturma potansiyelinden de faydalanılmasına karar verilmiştir ve bu amaçla, 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren OM_b ortamında kallus kültürleri kurulmuştur. Eksplant olarak yaklaşık 2 cm boyunda yapraklar, 1-1.5 cm uzunluğunda internodyumlar ve petioller kullanılmıştır. Bu eksplantlar 20 ml besin ortamı içeren 210 ml hacimli cam kültür kaplarında kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Kültürler sürekli karanlık ortamda ve 24 °C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

3.7 Ocak-Haziran 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.7.1 Materyal

Gemlik ve Domat çeşitlerinde bu dönem yapılan çalışmalar için serada kontrollü koşullarda muhafaza edilen fidanlardan alınan eksplantlar materyal olarak kullanılmıştır.

3.7.2 Metot

3.7.2.1 Serada muhafaza edilen Gemlik çeşidine ait fidanlardan nod kültürlerinin kurulması

Gemlik zeytin çeşidine ait fidanlardan alınan tek yıllık sürgünlerin 1.5-2.0 cm uzunluğunda ve 2 mm kalınlığında 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanılarak nod kültürü denemeleri oluşturulmuştur. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması Haziran-2012 ayında gerçekleştirilmiştir.

Sterilizasyon için eksplantlar, öncelikle %70'lik etil alkol içine 10 saniye daldırılmış, daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş %0.1'lik HgCl₂

içerisinde 3 dakika süreyle çalkalanmışlardır. Son olarak da eksplantlar üzerindeki sterilant maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır.

Sterilizasyonu yapılan bitkisel materyaller, daha önceden hazırlanıp kültür tüplerine paylaştırılan ortamlarda kültüre alınmışlardır. Denemelerde 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l dozlarında BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamı kullanılmıştır. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Kültürler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 4.000 lüks ışık şiddetinde ve 24°C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.7.2.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar

Kararmayı önlemeye yönelik denemeler için Domat çeşidine ait fidanlardan alınan henüz odunsu dokusu oluşmamış tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanılmıştır. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması Haziran-2012’de gerçekleştirilmiştir.

Kararma probleminin çözümü için kurulan denemelerin hepsinde eksplantlar Gemlik çeşidinde uygulanan sterilizasyon yöntemi ile steril edilmişlerdir. Besin ortamı olarak 0.25 mg/l zeatin, 20 g/l mannitol ve 6.5 g/l agar içeren ve pH’sı 5.8’e ayarlanmış OM_b kullanılmış ve zeatin filtre sterilizasyonu ile ortama eklenmiştir. Kültür kabı olarak tüp kullanılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 15 eksplant denenmiştir. Kültürler, 24°C sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ve 4.000 lüks ışık şiddeti koşullarına sahip kültür odasında muhafaza edilmişlerdir.

Domat çeşidinde ortaya çıkan kararma problemini azaltmak amacıyla aşağıda belirtilen denemeler yapılmıştır (Romano and Martins-Loução, 1992; Bhatt and Dhar, 2004; Mendoza-de Gyves et al., 2008; Ko et al., 2009; Çördük and Akı, 2011):

- **Uygulama 1:** Sterilizasyonu yapılan 1-2 cm uzunluğundaki tek nodlu eksplantlar, tüp içerisinde bulunan 0.25 mg/l zeatin içeren OM_b ortamına

transfer edilmiş ve 1 hafta süre ile +4 °C’de karanlıkta muhafaza edildikten sonra kültür odasına aktarılmışlardır.

- **Uygulama 2:** 0.25 mg/l zeatin içeren OM_b ortamının pH’sı 5.0’e ayarlanmış ve sterilizasyonu yapılan 1-2 cm boyutlarındaki tek nodlu eksplantlar tüpler içerisinde bulunan ortamlara yerleştirilmişlerdir.
- **Uygulama 3:** Eksplantların sterilizasyonundan sonra durulama için +4 °C’de steril saf su kullanılmıştır. Steril edilen eksplantlar tüpler içerisindeki besin ortamlarına yerleştirildikten sonra kültür odasında tutulmuşlardır.
- **Uygulama 4:** 100 mg/l Askorbik asit + 150 mg/l Sitrik asitin pH’sı 5,7’ye ayarlanıp filtre sterilizasyonundan geçirilerek besin ortamına eklenmişlerdir.
- **Uygulama 5:** Sterilizasyondan önce tek nodlu eksplantlar, 100 mg/l Askorbik asit + 150 mg/l Sitrik asit içeren çözeltide 1 saat süre ile, sterilizasyondan sonra ise steril saf su içerisine filtre sterilizasyonu ile eklenmiş yine aynı konsantrasyonlardaki Askorbik asit + Sitrik asit çözeltisinde 3 saat süre ile bekletildikten sonra kültür tüplerine aktararak kültür odasında muhafaza edilmişlerdir. Askorbik asit ve sitrik asit, ısı ile bozuldukları için filtre ile steril edilerek kullanılmışlardır.
- **Uygulama 6:** Eksplantlar 0.5 g/l polivinilpirolidon (PVP),
- **Uygulama 7:** 1.0 g/l PVP ve
- **Uygulama 8:** 5.0 g/l PVP içeren besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Polivinilpirolidon kullanılarak yapılan denemelerde PVP besin ortamına filtre sterilizasyonu ile ilave edilmiştir.
- **Uygulama 9:** Eksplantlar 0.5 g/l aktif karbon,

- **Uygulama 10:** 1.0 g/l aktif karbon ve
- **Uygulama 11:** 2.0 g/l aktif karbon içeren besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Aktif karbon, besin ortamına pH ölçüldükten sonra eklenmiştir.

3.7.2.3 Domat çeşidinde kallus kültürünün kurulması

Temmuz-Aralık 2011 döneminde 2 cm boyunda yapraklar, 1-1.5 cm uzunluğunda internodyumlar ve petioller kullanılarak bu eksplantların kallus oluşturma potansiyelleri değerlendirilmiş ve kallus için en iyi eksplantın petiol olduğuna karar verilmiştir. Bu dönemde Domat çeşidine ait fidanlardan alınan yeni sürgünlerin petiolleri kallus kültürlerini oluşturmak amacı ile eksplant olarak kullanılmışlardır. Eksplantların sterilizasyonu nod kültürlerindeki gibi yapılmıştır. Steril edilen eksplantlar 20 ml besin ortamı içeren 210 ml hacimli cam kültür kaplarında kültüre alınmışlardır. Besin ortamı olarak 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren OM_b ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda kallus sayısı arttırılmaya çalışılmıştır. Kültürler sürekli karanlık ortamda ve 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

3.7.2.4 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kültürlerinin kurulması

Gemlik ve Domat çeşitlerinde meristem kültürü için yeni çıkan sürgünler kullanılmış ve 2-3 cm uzunluğundaki sürgün uçlarının yaprakları uzaklaştırılarak sterilizasyon nod kültürlerinde olduğu gibi yapılmıştır. Besin ortamı olarak 0.5, 1.0, 2.0 mg/l zeatin içeren sıvı ve katı WPM ve OM_b kullanılmıştır (Çizelge 3.8). Kültürler Haziran ayında kurulmuştur. Zeatin besin ortamına filtre sterilizasyonu ile eklenmiştir (Şekil 3.7). Sıvı kültürler için tüplerin içerisine filtre kağıdından köprüler yapılarak tüpler içerisine yerleştirilmiş, hazırlanan sıvı ortamlar daha sonra beher yardımı ile bu tüpler içerisine dökülmüştür. Yine zeatin filtre sterilizasyonu ile besin ortamına eklenmiştir. Daha önce anlatıldığı gibi sterilizasyonu yapılan sürgünler stereo mikroskop altında 2 yaprak taslağı içerecek şekilde kesildikten sonra Çizelge 3.8'deki besin ortamlarına

aktarılmışlardır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 10 eksplant kullanılmıştır. Kùltürler, 24°C sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ve 4.000 lüks ışık şiddeti koşullarına sahip kùltür odasında muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.7 Zeatinin filtre sterilizasyonu ile besin ortamına eklenmesi

Çizelge 3.8 Seradaki Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kùltürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları

	Besin ortamları	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarı (mg/l)
1	OM _b	20 g/l Mannitol	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	0.5 ZEA
2	OM _b	20 g/l Mannitol	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	1.0 ZEA
3	OM _b	20 g/l Mannitol	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	2.0 ZEA
4	OM _b	20 g/l Mannitol	-	0.5 ZEA
5	OM _b	20 g/l Mannitol	-	1.0 ZEA
6	OM _b	20 g/l Mannitol	-	2.0 ZEA
7	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	0.5 ZEA
8	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	1.0 ZEA
9	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar (Duchefa)	2.0 ZEA
10	WPM	30 g/l Sukroz	-	0.5 ZEA
11	WPM	30 g/l Sukroz	-	1.0 ZEA
12	WPM	30 g/l Sukroz	-	2.0 ZEA

3.8 Temmuz-Aralık 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.8.1 Materyal

Gemlik zeytin çeşidine ait fidanlardan henüz odunsu dokusu oluşmamış tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanarak nod kültürü denemeleri kurulmuştur. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması 2012 Eylül ayında gerçekleştirilmiştir. Ancak Ekim ayı içerisinde Zeytin Güvesinin fidanlara verdiği zarardan dolayı genç sürgünler kullanılamaz hale gelmiş ve bu yüzden denemelere devam edilememiştir (Şekil 3.8). Fidanlara budama işlemi uygulandıktan sonra, 2 haftada bir 1ml/l konsantrasyonda Decis İnsektisit Emülsiyon Konsantresi ile ilaçlama yapılmıştır. Ayrıca yeni sürgün oluşumunu teşvik etmek amacı ile yine 2 haftada bir fidanlara 2 ml/l konsantrasyonda Orgamax Nitro II Azotlu (N) sıvı organomineral gübre yapraklara püskürtülerek uygulanmıştır.



Şekil 3.8 Zeytin güvesi ve bitkide oluşturduğu zarar

3.8.2 Metot

3.8.2.1 Serada muhafaza edilen Gemlik çeşidine ait fidanlardan nod kültürlerinin kurulması

Ocak-Haziran 2012 döneminde Gemlik çeşidinde kurulan nod kültürü denemelerinde görülen kararmalardan dolayı sürgün rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Bu dönemde materyal alınırken özellikle odunsu dokusu oluşmamış taze sürgünlerin alınmasına dikkat edilmiştir. Aksi takdirde Gemlik çeşidinde

kararma sorunu ortaya çıkmaktadır. Gemlik çeşidinde nod kültürleri için 1-2 cm uzunluğunda ve 1.5-2.0 mm genişliğinde nodal eksplantlar, öncelikle %70'lik etil alkol içine 10 saniye daldırılmış, daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş %0.1'lik Civa klorür içerisinde 3 dakika süreyle çalkalanmışlardır. Son olarak da eksplantlar üzerindeki sterilit maddeler gidinceye kadar steril saf su ile çalkalanmışlardır.

Sterilizasyonu yapılan bitkisel materyaller, daha önceden hazırlanıp kültür tüplerine paylaştırılan 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l konsantrasyonlarında BA, KİN ve GA₃ ve ayrıca 30 g/l sukroz ve 6.5 g/l Plant agar (Duchefa®, Haarlem, The Netherlands) içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.9). GA₃ ortama filtre sterilizasyonu ile eklenmiştir. Her bir deneme için 15 eksplant kullanılmış ve deneme üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Kültürler 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, 4000 lüks ışık şiddetinde ve 24°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.9 Seradaki Gemlik çeşidine ait fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamları

	Besin ortamları	Kullanılan karbon kaynağı ve miktarı (g/l)	Kullanılan agar ve miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarı (mg/l)
1	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	0.5 mg/l BA
2	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	1.0 mg/l BA
3	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	2.0 mg/l BA
4	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	4.0 mg/l BA
5	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	0.5 mg/l KİN
6	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	1.0 mg/l KİN
7	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	2.0 mg/l KİN
8	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	4.0 mg/l KİN
9	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	0.5 mg/l GA ₃
10	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	1.0 mg/l GA ₃
11	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	2.0 mg/l GA ₃
12	WPM	30 g/l Sukroz	6.5 g/l Plant agar	4.0 mg/l GA ₃

3.8.2.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar

Kararmayı önlemeye yönelik denemeler için Domat çeşidine ait fidanlardan alınan henüz odunsu dokusu oluşmamış tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanılmıştır. Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması Temmuz-2012 ayında gerçekleştirilmiştir. Gemlik çeşidinde karşılaşılan Zeytin Güvesi problemi Domat çeşidinde de ortaya çıkmıştır ve aynı uygulamalar Domat çeşidine de yapılmıştır.

Kararma problemi ile ilgili kurulan denemelerin hepsinde Gemlik çeşidine uygulanan sterilizasyon prosedürü uygulanmıştır. Besin ortamı olarak 2.0 mg/l BA, 20 g/l mannitol ve 6.5 g/l Plant agar içeren OM_b kullanılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 15 eksplant kültüre alınmıştır. Kültürler, 24°C sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ve 4000 lüks ışık şiddeti koşullarına sahip kültür odasında muhafaza edilmişlerdir.

Domat çeşidinde ortaya çıkan kararma problemini azaltmak amacıyla aşağıda belirtilen denemeler yapılmıştır:

- **Uygulama 1:** Sterilizasyonu yapılan 1-2 cm boyunda ve 2-4 mm genişliğinde tek nodlu eksplantlar, tüp içerisinde bulunan ve bakırlı bileşiği (CuSO₄.5H₂O) çıkarılmış 2.0 mg/l BAP içeren OM_b ortamına transfer edilmiştir.
- **Uygulama 2:** Eksplantlar sterilizasyondan sonra steril saf sudan geçirilerek steril peçete ile kurulanmışlardır. Zeytinyağı 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek eksplantların her tarafı kaplanacak şekilde muamele edilmiştir. Ardından tüpler içerisindeki 2.0 mg/l BAP içeren OM_b ortamında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.9).
- **Uygulama 3:** Sterilizasyondan sonra eksplantların durulandığı steril saf suyun pH'sı 7.0'a ayarlanarak otoklavda steril edilmiş ve sterilizasyonda bu su kullanılmıştır. Steril edilen eksplantlar tüpler içerisindeki besin ortamlarına yerleştirildikten sonra kültür odasında tutulmuşlardır.

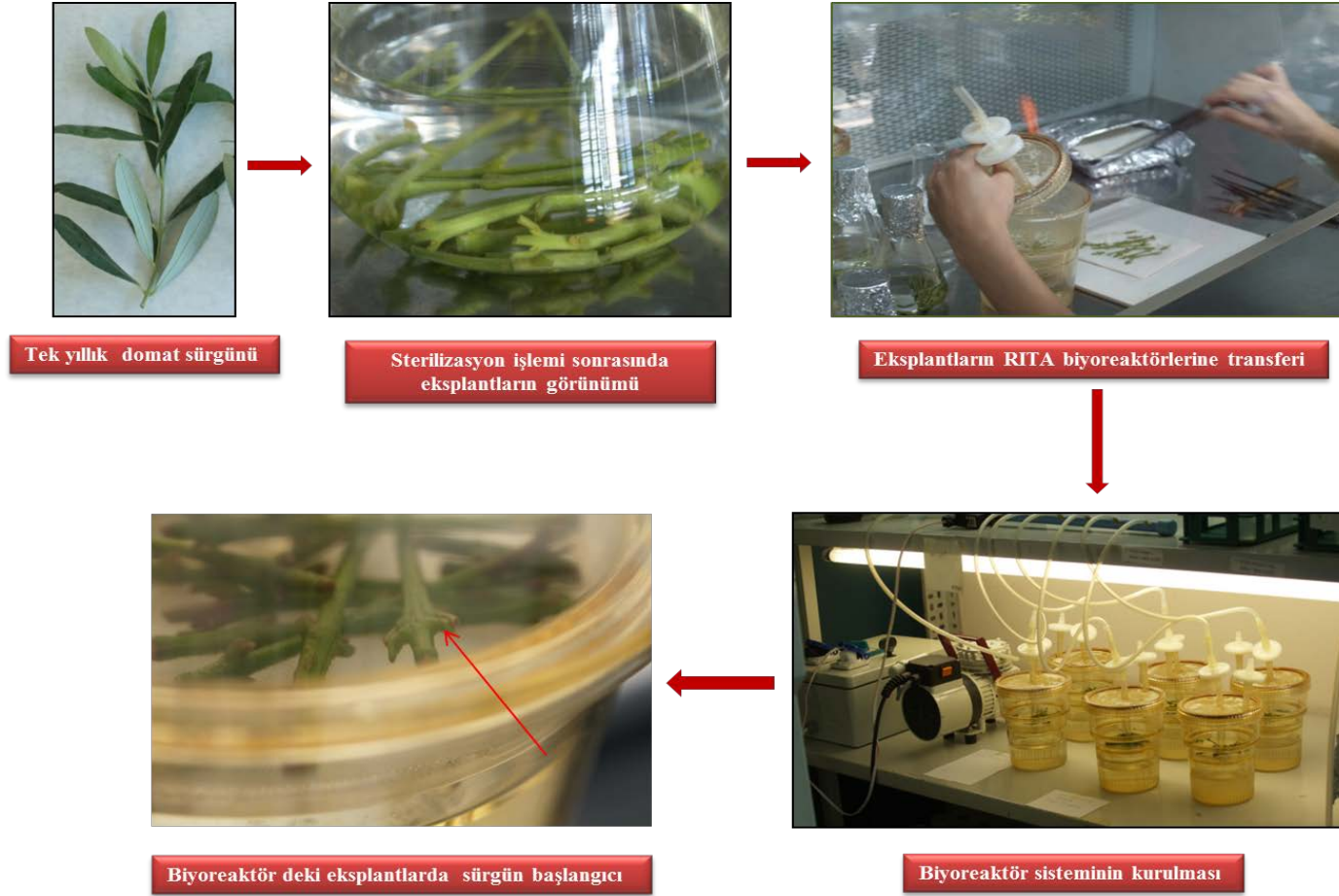
- **Uygulama 4:** Sterilizasyon işleminden sonra eksplantlar 3 yerine 6 defa steril saf sudan geçirilerek besin ortamına aktarılmışlardır.
- **Uygulama 5:** Tek nodlu eksplantlar yerine 2 nod içeren eksplantlar sterilizasyondan sonra 2.0 mg/l BAP içeren OM_b ortamı bulunan kültür tüplerine aktarılarak kültür odasında muhafaza edilmişlerdir (Şekil 3.10).
- **Uygulama 6:** Eksplantlar 3 nod içerecek şekilde kesilmiş ve steril edildikten sonra kültür tüplerine aktarılmıştır (Şekil 3.10).
- **Uygulama 7:** Eksplantlar besin ortamına yerleştirildikten sonra 4 hafta süre ile loş ışıktaki muhafaza edilmişlerdir.
- **Uygulama 8:** Fidandan kesilen sürgünlerin yaprakları uzaklaştırıldıktan sonra nodlarına parçalanmadan bütün halinde sterilizasyonları gerçekleştirilmiş ve sterilizasyondan sonra tek nod içerecek şekilde bisturi yardımı ile kesilip besin ortamına aktarılmışlardır.
- **Uygulama 9:** Geçici daldırma sistemi ile çalışan RITA biyoreaktörlerinde sıvı kültürlerde nodal eksplantlar kültüre alınmıştır. Besin ortamı olarak 2.0 mg/l BA, 20 g/l mannitol içeren sıvı OM_b kullanılmıştır. Hazırlanan sıvı ortam her biyoreaktöre 200 ml olacak şekilde biyoreaktörlere dökülmüş ve biyoreaktörlerin kapakları hafif gevşek bırakılarak kapatıldıktan sonra etrafları alüminyum folyo ile sarılarak otoklavda 121°C'de 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. İki nod içeren eksplantlar sterilizasyon işleminden sonra RITA biyoreaktörlerine transfer edilmişlerdir. Biyoreaktörlerin daldırma periyodu 1dakika/1 saat olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.9 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan zeytinyağı uygulaması



Şekil 3.10 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda kullanılan tek, iki ve üç nodlu eksplantlar (bar=1cm)



Şekil 3.11 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda kullanılan RITA bitoreaktörlerinde kültürlerin kurulması

3.8.2.3 Serada muhafaza edilen Gemlik ve Domat çeşitlerine ait fidanlardan meristem kültürlerinin kurulması

Meristem kütürü denemelerinde daha önce yapılan çalışmalarda farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren değişik besin ortamları kullanılmış fakat eksplantlarda kararmalar gözlenmiştir. Bu dönemdeki çalışmamızda her iki çeşitten izole edilen meristemler doğrudan besin ortamına değil, pamuk, mısır ve tütün kallusundan oluşturulan nörs dokular üzerine transfer edilmişlerdir.

3.8.2.3.1 Meristem kültürlerinde nörs doku olarak kullanılan kallusların hazırlanması

3.8.2.3.1.1 Pamuk kallusu

Kültür tüplerine pamuk kallusları için 1.6 g/l $MgCl_2$, 0.1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l KİN, 30 g/l glukoz, 6.5 g/l Plant agar, B5 vitaminleri ve MS tuzlarını içeren yarı katı besin ortamı hazırlanmıştır. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde yürütülen Güntürkün Kır'a ait bir çalışmadan temin edilen pamuk kallusları yaklaşık 1 cm çapında kitle halinde alınarak bu besin ortamının bulunduğu kültür tüplerine yerleştirilmiş, daha sonra stereo mikroskop altında izole edilen 2 yaprak taslağı ile birlikte meristem bu kallus dokuları üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.12). Oluşturulan meristem kültürleri 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C'de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.8.2.3.1.2 Tütün kallusu

Tütün kallusu için öncelikle tütün tohumları kültüre alınmıştır. Tohumlar küçük olduğundan filtre kağıdından yapılan paketler içine yerleştirilmiş ve bu şekilde steril edilmişlerdir. Sterilizasyon için tohumları içeren paketler öncelikle 2 dakika süre ile %70'lik etil alkolde bekletilmiş daha sonra içerisine 3 damla Tween-20 damlatılmış %15'lik NaOCl solüsyonunda 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. En son olarak 3 defa steril saf su ile çalkalanan tohumlar steril peçete üzerinde kurutulduktan sonra tüplere hazırlanmış ½ MS ortamında kültüre

alınmışlardır. Yaklaşık 1 ay sonra tohumlardan çıkan bitkicikler cam kültür kaplarında (210 cc hacimli) MS ortamında alt kültüre alınmışlardır. Altkültürden büyüyen bitkiciklerin yaprak ve gövdeleri 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınarak kallus elde edilmiştir. Nörs doku için, oluşturulan bu kallus yığınlarından yaklaşık 1 cm çapında alınarak daha önce kültür tüplerine hazırlanan kallus büyüme ortamına yerleştirilmiş ve izole edilen meristemler bu kallus yığınları üzerine transfer edilmişlerdir (Şekil 3.12). Kültürler 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.8.2.3.1.3 Mısır kallusu

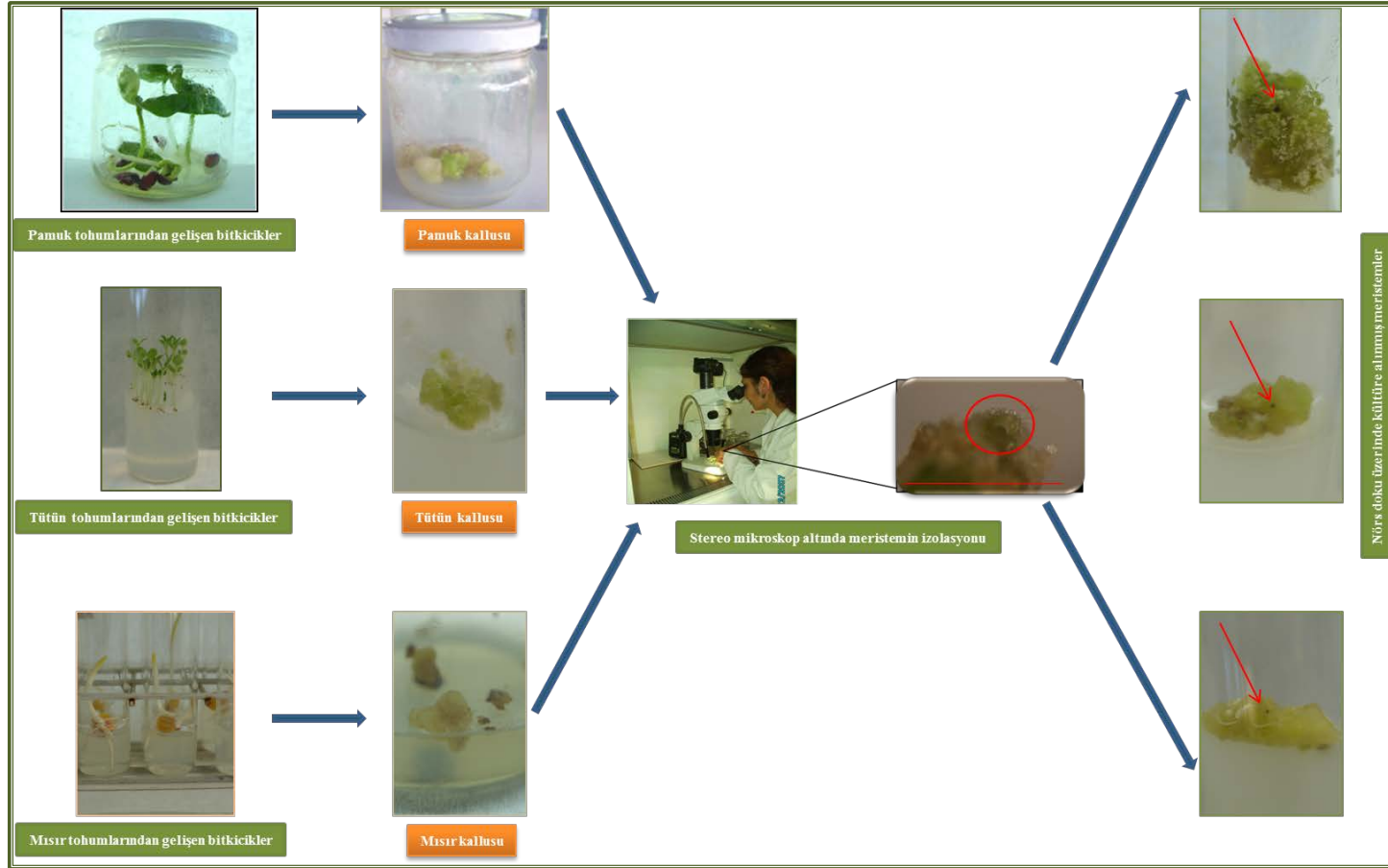
Kallus kültürünün oluşturulmasında tohumdan elde edilen bitkiciklerin yaprak, gövde ve kökleri kullanılmıştır. Tohumlar 5 dakika süre ile %70’lik etil alkolde tutulmuş, daha sonra içerisine 3 damla Tween-20 damlatılmış %0.1’lik $HgCl_2$ ile 10 dakika çalkalanmışlardır. Üç defa steril saf sudan geçirilen tohumlar steril peçete üzerinde kurutulduktan sonra MS ortamı hazırlanmış tüplerde kültüre alınmışlardır. Kültürden 1 ay sonra gelişen bitkiciklerin yaprak, kök ve gövdeleri cam kültür kaplarına (210 cc hacimli) hazırlanmış 0.5 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l KİN içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi kallus gelişimi köklerde gözlenmiş ve altkültür ile kalluslar çoğaltılmıştır. Diğer nörs doku kültürlerinin hazırlandığı gibi kültür tüplerine mısır kallus ortamı hazırlanmış ve kallus kitlelerinden yaklaşık 1 cm çapında olacak şekilde alınarak kültür tüplerine yerleştirilmiş ve üzerlerine izole edilen meristemler yerleştirilmiştir (Şekil 3.12). Mısır kallusları sürekli karanlıkta geliştirilmiş meristem kültürleri oluşturulduktan sonra 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta, 24°C’de ve 4000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

3.8.2.4 Domat çeşidinde kallus kültürünün kurulması

Daha önce elde edilen kalluslar bu dönemde yine kendi ortamında altkültüre alınmışlardır.

3.9 Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmalar süresince yapılan uygulamalar tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak üç tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler, TARİST istatistik programı (Açıkgöz vd., 2004) kullanılarak değerlendirilmiştir. Domat çeşidi için yapılan kararma problemine yönelik çalışmalar 2 faktörlü (uygulama, süre), Gemlik ve Domat çeşitleri için yapılan diğer çalışmalar ise kendi içlerinde sterilizasyon, besin ortamı, eksplant kaynağı gibi tek faktörlü olarak düzenlenmiştir.



Şekil 3.12 Meristemlerin izolasyonu ve nörs doku üzerinde kültüre alınması (bar=1 cm)

4. BULGULAR

4.1 Ocak-Haziran 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.1.1 Seradaki Gemlik fidanlarından kurulan nod kültürlerinden elde edilen sonuçlar

Bu dönemde alınan materyallerin sterilizasyonu için deneme kurulmamış ve eksplantlar daha önce Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Laboratuvarı'nda zeytinle ilgili yapılan bir çalışmadan elde edilen prosedür ile steril edilmişlerdir. Eksplantlar 1 saat süreyle akan suyun altında bekletildikten sonra, meydana gelebilecek kararmaları önlemek amacıyla 100 mg/l Askorbik asit çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilmişlerdir. Ertesi gün nodal eksplantlar, önce %70'lik etil alkol içine birkaç saniye daldırılmış, daha sonra %10'luk NaOCl solüsyonunda 10 dakika steril edilmişlerdir. Steril edilen nodal eksplantlar Çizelge 3.2'de belirtilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Uygulanan bu sterilizasyon yöntemine göre Gemlik çeşidinde 30 gün sonunda kültürden elde edilen steril eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%) ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Gemlik çeşidinde farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarda uygulanan sterilizasyon yöntemine göre elde edilen sterilizasyon başarısı ortalama %28.89-%80.00 arasında değişmektedir (Çizelge 4.1). Yapılan istatistiki değerlendirmeye göre, elde edilen steril eksplant yüzdesi %5 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). LSD sınıflandırmasına göre steril eksplant yüzdesinin en fazla (%80) olduğu 5. besin ortamı 1. grupta yer alırken, bunu %66.67-%77.78 steril eksplant yüzdeleri ile 3, 7, 1, 4, 9, 10. besin ortamları takip etmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra steril eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Steril eksplant sayısı (adet)				Steril eksplant yüzdesi (%)			
			T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
OM _b	Kontrol	0	12	11	9	10.67	80.00	73.33	60.00	71.11 ab
	BA	1	9	8	7	8.00	60.00	53.33	46.67	53.33 abcd
		2	10	12	13	11.67	66.67	80.00	86.67	77.78 ab
	KİN	1	10	10	10	10.00	66.67	66.67	66.67	66.67 ab
		2	12	13	11	12.00	80.00	86.67	73.33	80.00 a
	ZEA	1	12	9	2	7.67	80.00	60.00	13.33	51.11 bcd
		2	14	13	6	11.00	93.33	86.67	40.00	73.33 ab
DKW	Kontrol	0	7	9	8	8.00	46.67	60.00	53.33	53.33 abcd
	BA	1	10	10	10	10.00	66.67	66.67	66.67	66.67 ab
		2	11	11	8	10.00	73.33	73.33	53.33	66.67 ab
	KİN	1	6	10	12	9.33	40.00	66.67	80.00	62.22 abc
		2	3	8	2	4.33	20.00	53.33	13.33	28.89 d
	ZEA	1	8	10	8	8.67	53.33	66.67	53.33	57.78 abc
		2	9	4	4	5.67	60.00	26.67	26.67	37.78 cd

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

** Testte kullanılan HKO değeri 270.904; LSD değeri 27.548'dir.

Çizelge 4.2 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında steril eksplant yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	13	8361.341	643.180	2.374*	2.103	2.868
Hata	28	7585.304	270.904			
Genel	41	388.943	388.943			

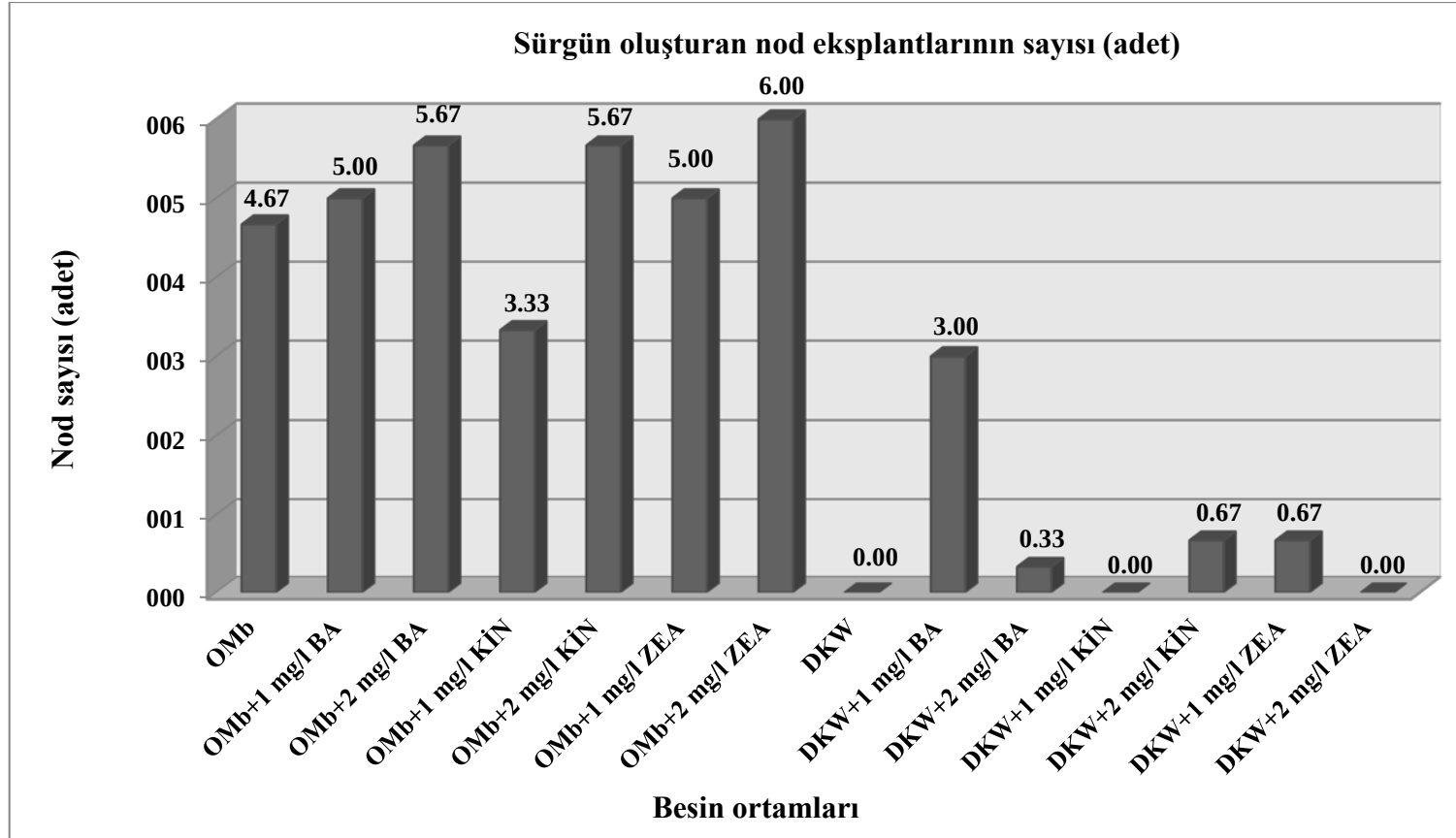
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

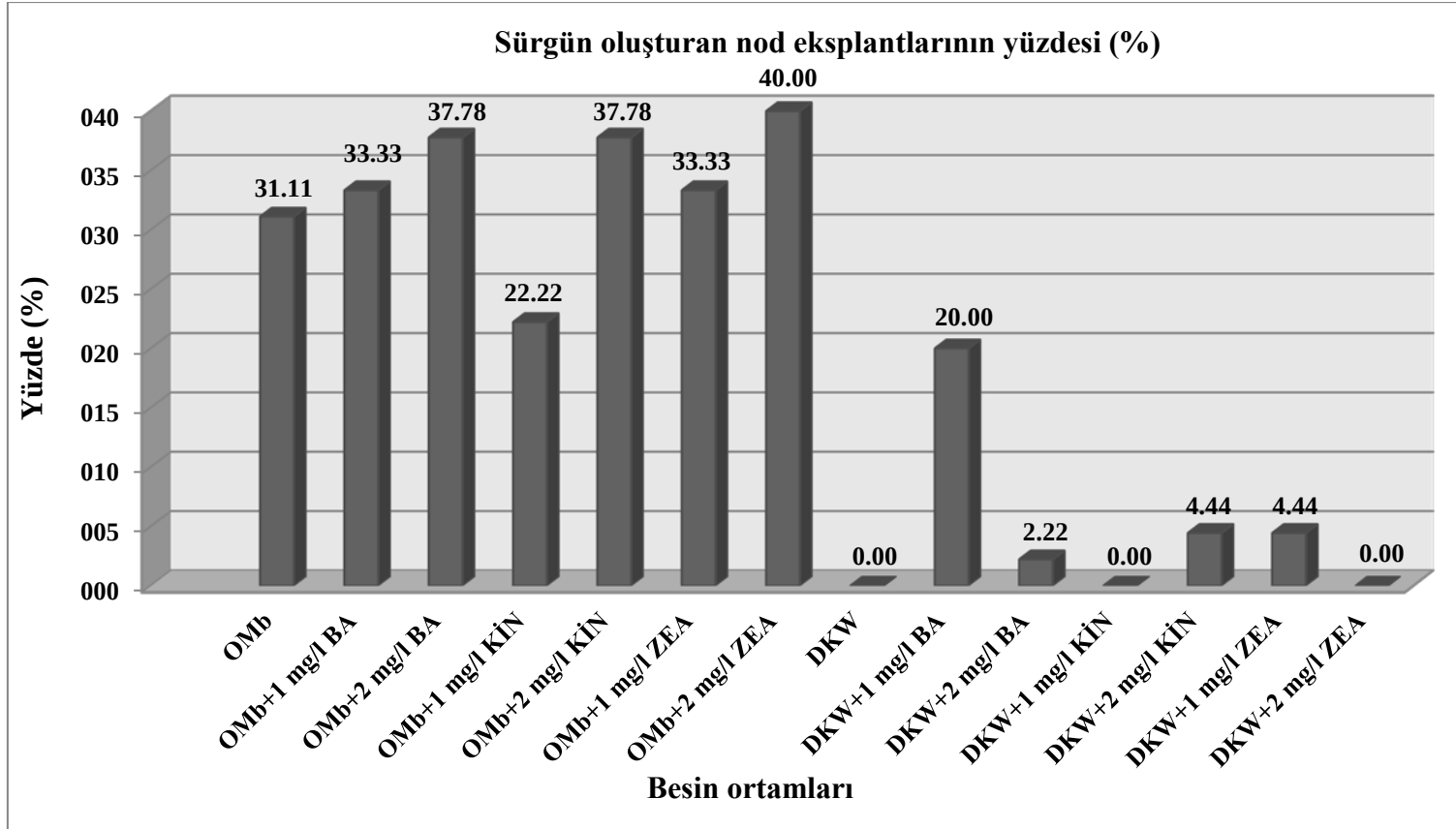
Ocak-Haziran 2009 döneminde seradaki Gemlik fidanlarından alınan nodal eksplantlar Çizelge 3.2’de belirtilen besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu denemeden elde edilen; sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%), nod eksplantlarının oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (adet), nod eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet) Çizelge 4.3 ve 4.4’de gösterilmiştir. İstatistiki analizler sonucunda, sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (6 adet) ve yüzdesi (%40), nod eksplantlarının oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (31 adet), nod eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayısı (0.69 adet) en fazla 2 mg/l ZEA içeren OM_b ortamında gözlenmekle birlikte, besin ortamları arasında bu özellikler bakımından istatistiksel düzeyde bir fark bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca, kullanılan temel besin ortamları açısından bakıldığında, incelenen tüm özellikler bakımından OM_b ortamının DKW ortamına göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.1; Şekil 4.2; Şekil 4.3; Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%)

Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
			T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
OM _b	Kontrol	0	10	4	0	4.67	66.67	26.67	0.00	31.11
	BA	1	9	5	1	5.00	60.00	33.33	6.67	33.33
		2	6	5	6	5.67	40.00	33.33	40.00	37.78
	KİN	1	6	2	2	3.33	40.00	13.33	13.33	22.22
		2	10	4	3	5.67	66.67	26.67	20.00	37.78
	ZEA	1	10	4	1	5.00	66.67	26.67	6.67	33.33
		2	12	6	0	6.00	80.00	40.00	0.00	40.00
DKW	Kontrol	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	BA	1	9	0	0	3.00	60.00	0.00	0.00	20.00
		2	1	0	0	0.33	6.67	0.00	0.00	2.22
	KİN	1	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		2	2	0	0	0.67	13.33	0.00	0.00	4.44
	ZEA	1	1	0	1	0.67	6.67	0.00	6.67	4.44
		2	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



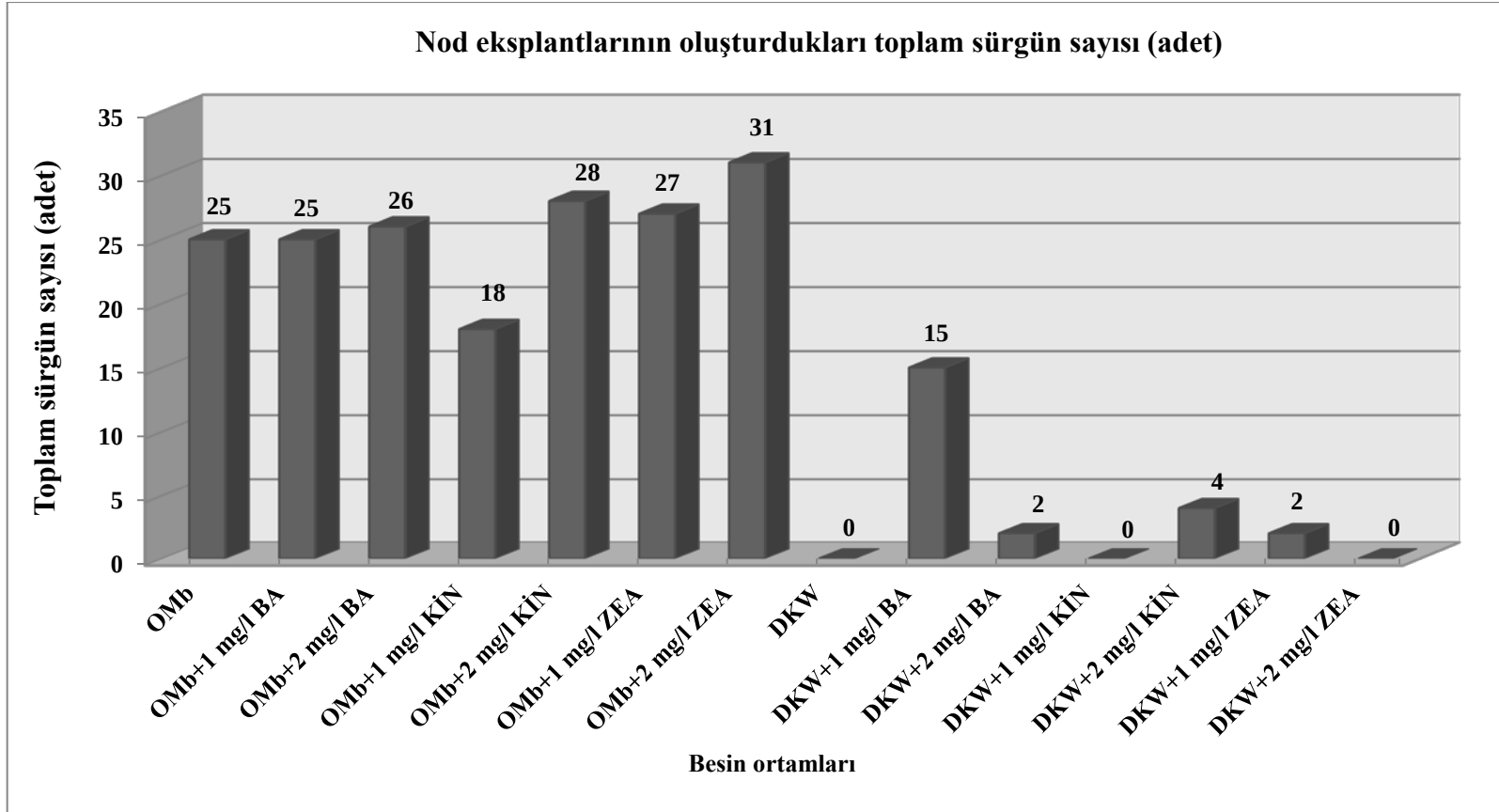
Şekil 4.1 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)



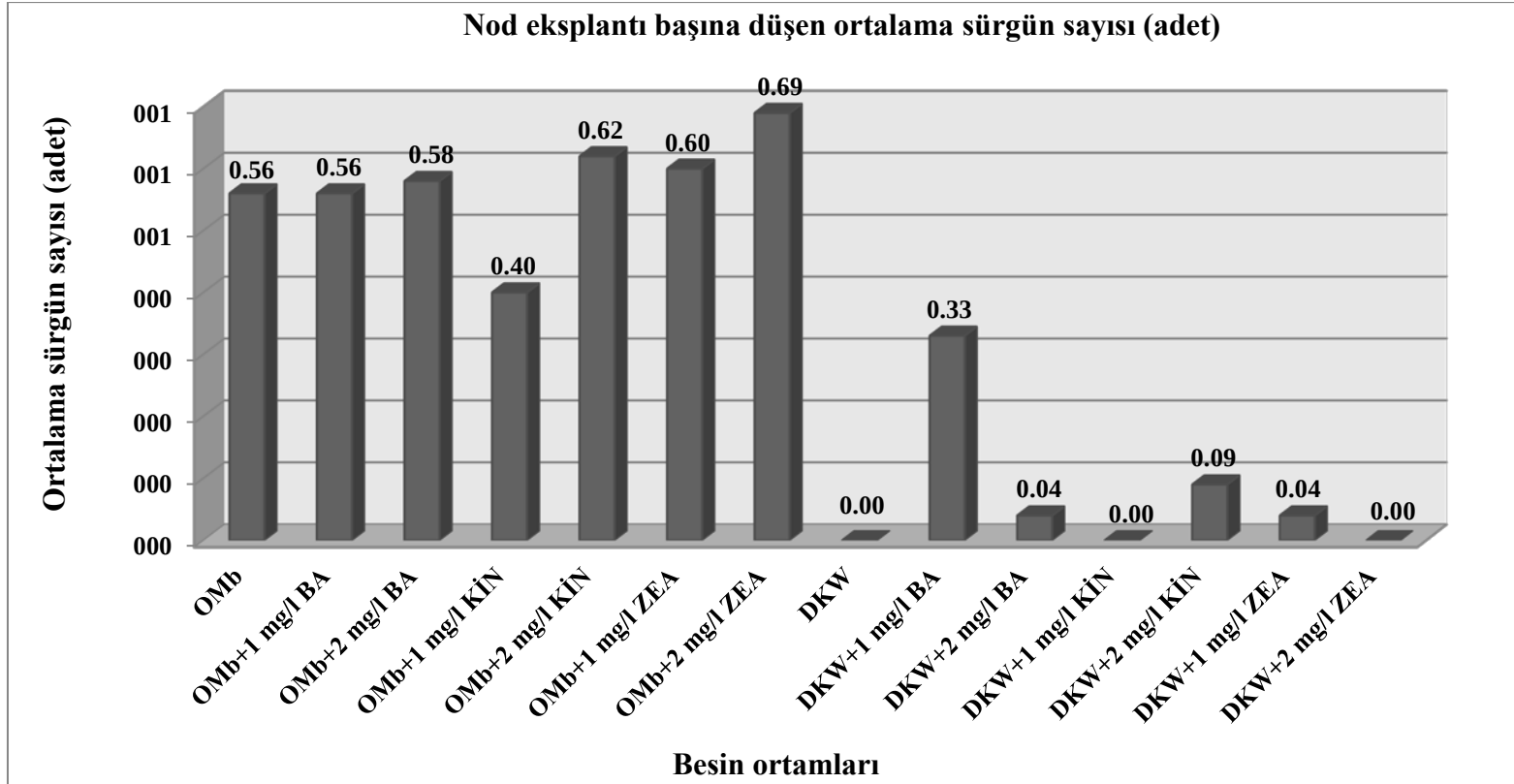
Şekil 4.2 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)

Çizelge 4.4 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının kültüre alındıktan 30 gün sonra oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (adet) ve eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet)

Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Nod eksplantlarının oluşturdıkları toplam sürgün sayısı (adet)				Nod eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet)			
			T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
OM _b	Kontrol	0	21	4	0	25	1.40	0.27	0.00	0.56
	BA	1	17	6	2	25	1.13	0.40	0.13	0.56
		2	11	5	10	26	0.73	0.33	0.67	0.58
	KİN	1	12	3	3	18	0.80	0.20	0.20	0.40
		2	19	6	3	28	1.27	0.40	0.20	0.62
	ZEA	1	21	5	1	27	1.40	0.33	0.07	0.60
		2	22	9	0	31	1.47	0.60	0.00	0.69
	Kontrol	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
DKW	BA	1	15	0	0	15	1.00	0.00	0.00	0.33
		2	2	0	0	2	0.13	0.00	0.00	0.04
	KİN	1	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
		2	4	0	0	4	0.27	0.00	0.00	0.09
	ZEA	1	1	0	1	2	0.07	0.00	0.07	0.04
		2	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.3 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının oluşturdukları toplam sürgün sayısı (adet)

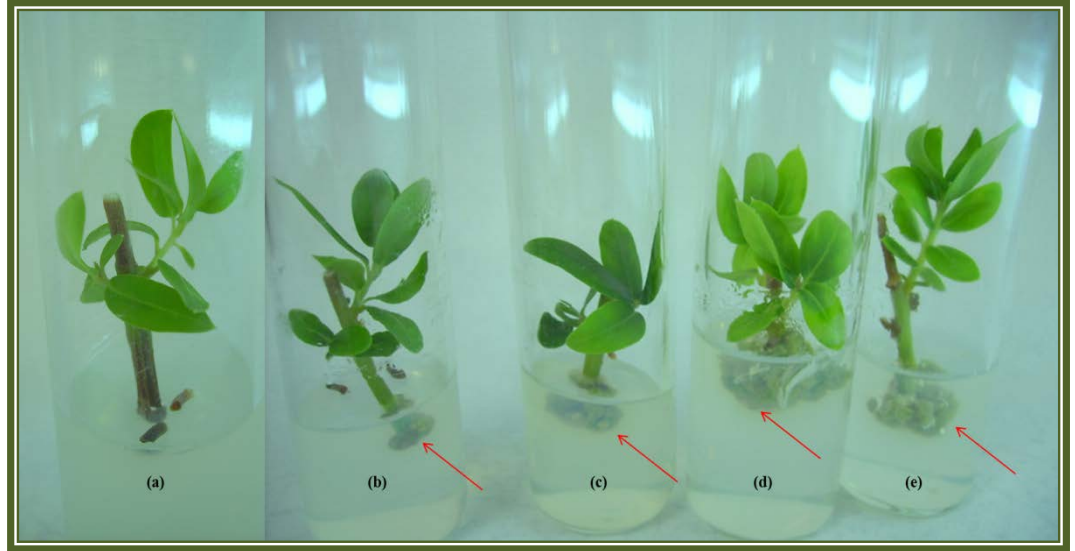


Şekil 4.4 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KIN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarının oluşturdukları eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet)

Ocak-Haziran 2009 döneminde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarda en iyi sürgün gelişimi ZEA içeren besin ortamlarında gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bunun dışında bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında eksplantların bazal kısımlarında kallus oluşumları gözlenmezken, bitki büyüme düzenleyicisi ilave edilmiş besin ortamlarında eksplantların bazal kısımlarında yoğun bir kallus oluşumu meydana gelmiştir. En büyük kallus oluşumları ise ZEA içeren besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda gözlenmiştir ve ayrıca bunlardan gelişen sürgünlerin yapraklarının diğer ortamdakilere göre daha açık yeşil olduğu görülmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Gemlik çeşidinde Ocak-Haziran 2009 döneminde zeatinli ortamlarda kültüre alınan nodal eksplantlardan gelişen sürgünler



Şekil 4.6 Gemlik çeşidinde Ocak-Haziran 2009 döneminde kültüre alınan nodal eksplantlardan (a) OM_b ortamında gelişen ve bazal kısmında kallus oluşturmeyan (b) 2 mg/l KİN (c) 2 mg/l BA (d) ve (e) 2 mg/l zeatin içeren OM_b ortamlarında gelişen ve bazal kısımlarında kallus oluşturan sürgünler

4.1.2 Seradaki Domat fidanlarından kurulan nod kültürlerinden elde edilen sonuçlar

Ocak-Haziran 2009 döneminde seradaki Domat fidanlarından alınan nodal eksplantlar Gemlik fidanlarına uygulanan sterilizasyon yöntemi ile steril edilip Çizelge 3.2’de belirtilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Uygulanan bu sterilizasyon yöntemine göre Domat çeşidinde elde edilen steril eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%) ile ilgili bilgiler Çizelge 4.5’de gösterilmektedir.

Domat çeşidinde uygulanan sterilizasyon yöntemine göre kullanılan besin ortamlarındaki steril eksplant oranı %13.33-%55.56 arasında, ortalama steril eksplant sayısı ise 2.00-8.33 adet arasında değişmektedir (Çizelge 4.5). İstatistiki değerlendirmeden elde edilen sonuçlara göre elde edilen steril eksplant yüzdesi %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Yapılan LSD sınıflandırmasına göre steril eksplant yüzdesinin en fazla (%55.56) olduğu 12. ve 14. besin ortamları 1. grupta yer alırken, bunu %53.33 steril eksplant yüzdesi ile 8. ve 13. besin ortamları takip etmektedir (Çizelge 4.6). Sterilizasyon oranlarının düşük olmasından dolayı sürgün rejenerasyonu ile ilgili detaylı gözlem yapılamamıştır.

Çizelge 4.5 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında kültüre alındıktan 30 gün sonra steril eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Steril eksplant sayısı (adet)				Steril eksplant yüzdesi (%)			
			T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
OM _b	Kontrol	0	6	2	3	3.67	40.00	13.33	20.00	24.44 abc
	BA	1	2	1	3	2.00	13.33	6.67	20.00	13.33 c
		2	4	0	5	3.00	26.67	0.00	33.33	20.00 bc
	KİN	1	4	5	11	6.67	26.67	33.33	73.33	44.44 abc
		2	1	6	5	4.00	6.67	40.00	33.33	26.67 abc
	ZEA	1	0	6	2	2.67	0.00	40.00	13.33	17.78 c
		2	3	5	7	5.00	20.00	33.33	46.67	33.33 abc
DKW	Kontrol	0	5	8	11	8.00	33.33	53.33	73.33	53.33 ab
	BA	1	2	5	4	3.67	13.33	33.33	26.67	24.44 abc
		2	4	5	0	3.00	26.67	33.33	0.00	20.00 bc
	KİN	1	6	5	6	5.67	40.00	33.33	40.00	37.78 abc
		2	6	12	7	8.33	40.00	80.00	46.67	55.56 a
	ZEA	1	9	6	9	8.00	60.00	40.00	60.00	53.33 ab
		2	9	4	12	8.33	60.00	26.67	80.00	55.56 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

** Testte kullanılan HKO değeri 228.554; LSD değeri 34.110'dur.

Çizelge 4.6 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında steril eksplant yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	13	9354.220	719.555	3.148**	2.103	2.868
Hata	28	6399.511	228.554			
Genel	41	15753.731	384.237			

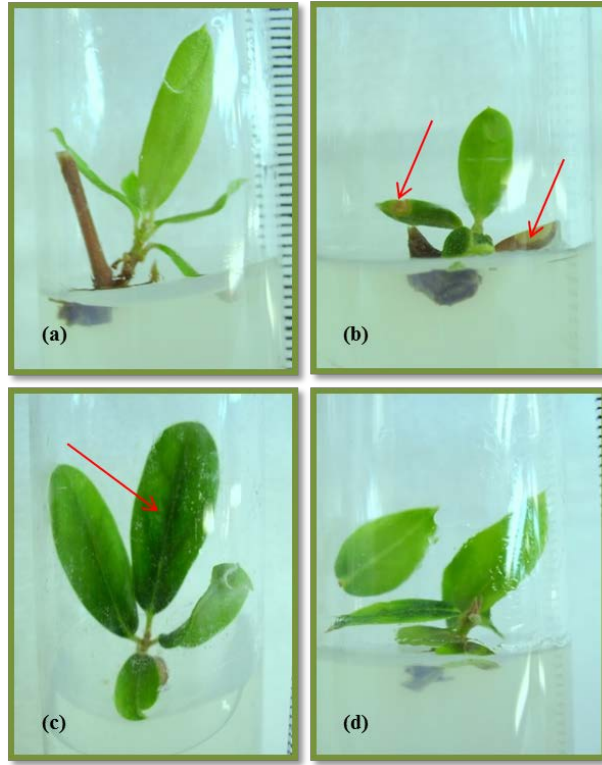
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

4.2 Temmuz-Aralık 2009 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.2.1 Sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalar

Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan çalışmalardan elde edilen *in vitro* sürgünler, sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacı ile Çizelge 3.3’de belirtilen besin ortamlarında altkültüre alınmıştır. Eksplantlar, bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda ve 6 yapraklı tekli sürgünler halinde kültüre alınmışlardır. Hem Gemlik çeşidi, hem de Domat çeşidinde 14 farklı ortamda kültüre alınan eksplantlarda 3 haftaya kadar bitki boyunda, sürgün sayısında ve yaprak sayısı ve büyüklüğünde dikkate değer bir büyüme gerçekleşmediği gibi bu dönemden sonra; açık yeşil yapraklı sürgünler, yaprak nekrozisi, yaprak ana damarlarının koyu yeşil diğer kısımları açık yeşil olan sürgünler ve yaprak absisyonu gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Gemlik ve Domat çeşitlerinde gözlenen (a) açık yeşil yapraklı sürgün (b) yaprak nekrozisi (c) yaprak ana damarlarının koyu yeşil diğer kısımların açık yeşil olduğu sürgünler (d) yaprak absisyonu

4.2.2 Seradaki fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

4.2.2.1 Gemlik fidanlarından alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Gemlik çeşidine ait serada muhafaza edilen fidanlardan alınan nodal eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl solüsyonları kullanılarak yapılan sterilizasyon uygulamaları sonucunda, elde edilen sterilizasyon başarı yüzdeleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Uygulanan NaOCl konsantrasyonlarına göre sterilizasyon başarısı %10'luk NaOCl uygulaması için %64.00, %15'lik NaOCl uygulaması için %97.33 olmuştur.

Çizelge 4.7 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)**

NaOCl konsantrasyonu	Steril eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
%10	72.00	60.00	60.00	64.00 b
%15	100	96.00	96.00	97.33 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 25 adettir.

** Testte kullanılan HKO değeri 26.667; LSD değeri 19.413’tür.

Gemlik çeşidinde %10 ve %15’lik NaOCl ile sterilizasyon sonucunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları incelendiğinde iki farklı konsantrasyonun sterilizasyon başarısı üzerine istatistiksel olarak %1 düzeyinde etki ettiği görülmektedir (Çizelge 4.8). Sterilizasyon uygulamasının sonuçlarını gruplandırmak amacıyla yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.7’de sunulmuştur. İstatistiki analizler sonucunda, %15’lik NaOCl uygulaması %97.33 başarı ile birinci grupta, %10’luk NaOCl uygulaması ise %64.00 ile ikinci grupta yer almıştır.

Çizelge 4.8 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	1666.667	1666.667	62.500**	7.710	21.200
Hata	4	106.667	26.667			
Genel	5	1773.333	354.667			

*= α :0,05 önemlilik düzeyi

**= α :0,01 önemlilik düzeyi

Sterilizasyon uygulamalarının eksplantların kararması üzerine etkileri de ayrıca incelenmiştir. Bu konuya ait veriler Çizelge 4.9’da gösterilmiştir. Sodyum hipoklorit konsantrasyonuna göre en fazla kararma (%17.33) %15’lik NaOCl uygulanmasında gözlenmiştir. Yapılan istatistiki analize göre NaOCl konsantrasyonunun kararma üzerine etkisi %1 düzeyinde önemli bulunurken (Çizelge 4.10), LSD analiz sonuçlarına göre %15’lik uygulamadan elde edilen değer (%17.33) birinci grupta yer almıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%)**

NaOCl konsantrasyonu	Kararan eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
%10	8	8	4	6.67 b
%15	16	20	16	17.33 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 25 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 5.333; LSD değeri 8.682’dir.

Çizelge 4.10 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	170.667	170.667	32.000**	7.710	21.200
Hata	4	21.333	5.333			
Genel	5	192.000	38.400			

*= α :0,05 önemlilik düzeyi

**= α :0,01 önemlilik düzeyi

Gemlik fidanlarından alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon prosedürü başarılı olduğundan (%10 ve %15'lik NaOCl ile 10dk sterilizasyon) ve bu çeşitte yüksek oranda kararma sorununa yol açmadığından kültüre alınan eksplantlarda sürgün çıkışları gözlenmiştir. Yapılan sterilizasyon uygulamasına göre; sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet), sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%), nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) verileri de ayrıca incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.11; Çizelge 4.13 ve Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Tüm incelenen parametreler için en iyi sonuçlar %15'lik sodyum hipoklorit ile steril edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Sürgün çıkışları 2 hafta içinde ve bilateral sürgün rejenerasyonu şeklinde olmuştur (Şekil 4.10).

Çizelge 4.11 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

NaOCl uygulaması	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
%10	18	18	18	18.00	72.00	72.00	72.00	72.00 b
%15	21	22	21	21.33	84.00	88.00	84.00	85.33 a

* Eksplant sayısı tekrerr başına 25 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 2.667; LSD değeri 6.139'dur

Çizelge 4.12 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

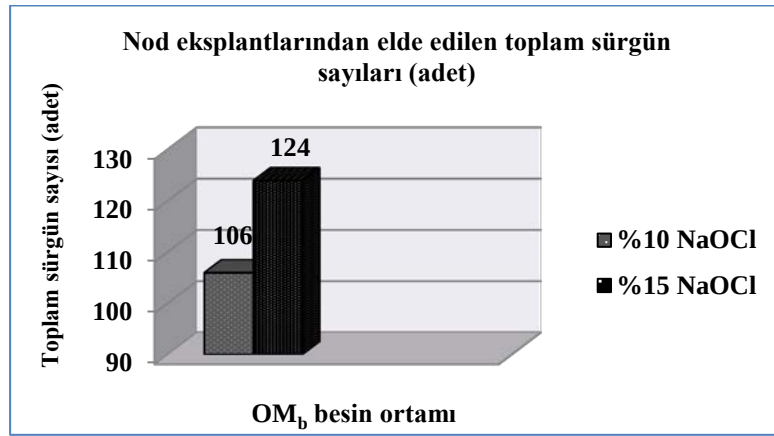
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	266.667	266.667	100.000**	7.710	21.200
Hata	4	10.667	2.667			
Genel	5	277.333	55.467			

*= α :0,05 önemlilik düzeyi

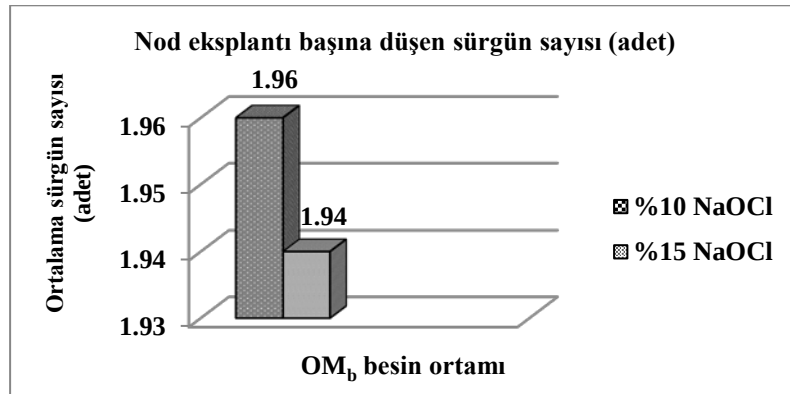
**= α :0,01 önemlilik düzeyi

Çizelge 4.13 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

NaOCl uygulaması	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
%10	35	35	36	106	1.94	1.94	2.00	1.96
%15	41	42	41	124	1.95	1.91	1.95	1.94



Şekil 4.8 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



Şekil 4.9 Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)



Şekil 4.10 Gemlik fidanlarından alınan eksplantlardan rejenere olan sürgünler (bar=1cm)

4.2.2.2 Domat fidanlarından alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Domat çeşidine ait fidanlardan alınan nodal eksplantlara yapılan sterilizasyon uygulamalarında NaOCl %10 ve %15’lik konsantrasyonlarda denenmiştir. Yapılan istatistiki analize göre kullanılan farklı NaOCl konsantrasyonlarının sterilizasyon sonucuna etkileri önemsiz bulunmuştur. Yürütülen denemelerde konsantrasyona göre sterilizasyon başarısı; %10’luk konsantrasyonda %37.33 ve %15’lik konsantrasyonda %48.00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)

NaOCl konsantrasyonu	Steril eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
%10	40.00	36.00	36.00	37.33
%15	44.00	44.00	56.00	48.00

* Eksplant sayısı tekerrür başına 25 adettir.

Sterilizasyon amacı ile uygulanan farklı NaOCl uygulamalarının Domat çeşidine ait nodal eksplantlarda meydana getirdiği kararmalara ait yüzde değerler Çizelge 4.15’de verilmiştir. Yapılan istatistiki analize göre kullanılan NaOCl konsantrasyonlarının kararma üzerine etkileri %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.16). Buna göre, en fazla kararma oranı (%60.00) %15’lik NaOCl solüsyonu ile steril edilen eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%)

NaOCl konsantrasyonu	Kararan eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
%10	44.00	40.00	40.00	41.33 b
%15	56.00	60.00	64.00	60.00 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 25 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 10.667; LSD değeri 12.278’dir

Çizelge 4.16 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	522.667	522.667	49.000**	7.710	21.200
Hata	4	42.667	10.667			
Genel	5	565.333	113.067			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

Domat çeşidinde %10 ve %15’lik NaOCl ile sterilizasyon uygulamalarından istenilen oranda steril eksplant elde edilemediğinden, başka bir uygulamada eksplantlar 24 saat fungusitte bekletilmiş daha sonra NaOCl ile sterilizasyona tabi tutulmuşlardır. Eksplantlar fungusit ön uygulamasından sonra, farklı konsantrasyonlarda (%7.5 ve %10) ve sürelerde (7.5 dk ve 10 dk) NaOCl solüsyonu ile steril edilmişlerdir. Bu uygulamaya ait sonuçlar Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.

Domat çeşidine ait eksplantlar 24 saatlik fungusit ön muamelesine tabi tutulduklarında steril eksplant yüzdesi, fungusit ön muamelesi yapılmayan eksplantlara göre oldukça artmıştır. Fungusitle muamele edilen eksplantlarda en yüksek steril eksplant yüzdesi, %10’luk NaOCl’de 10 dakika bekletilen eksplantlarda olmuştur (%78.33) (Çizelge 4.17).

Yapılan istatistiki analize göre sterilizasyon başarısı üzerine NaOCl konsantrasyonunun ve uygulama süresinin etkisi %1 düzeyinde önemli bulunurken, NaOCl konsantrasyonu*süre interaksiyonunun etkisi önemli çıkmamıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.17 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'lük NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre 30 gün sonunda elde edilen steril eksplant yüzdeleri *(%)

NaOCl konsantrasyonu	NaOCl uygulama süresi	Steril eksplant yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.
%10	7.5 dk	70.00	75.00	70.00	71.66
	10 dk	75.00	80.00	80.00	78.33
%7.5	7.5 dk	55.00	50.00	55.00	53.33
	10 dk	65.00	65.00	60.00	63.33

* Eksplant sayısı tekrerr başına 20 adettir.

Çizelge 4.18 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'lük NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre 30 gün sonunda elde edilen steril eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	833.333	833.333	100.000**	5.320	11.260
Süre	1	208.333	208.333	25.000**	5.320	11.260
Konsantrasyon*süre	1	8.333	8.333	1.000ns	5.320	11.260
Hata	8	66.667	8.333			
Genel	11	1116.667	101.515			

ns=not significant (önemsiz)

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

LSD değerlendirmesinden elde edilen sonuçlara göre, süre açısından 10 dakikalık NaOCl uygulamasından elde edilen ortalama steril eksplant yüzdesi %70.83'lük değerle ve konsantrasyon açısından %10'luk NaOCl uygulamasından elde edilen steril eksplant yüzdesi %75.00'lik değerle ilk grupta yer almıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantlara uygulanan 24 saat fungusitte bekletme ve %10 ve %7.5'luk NaOCl ile 7.5 ve 10 dakika muamele sonuçlarına göre elde edilen steril eksplant yüzdeleri ile ilgili LSD gruplandırması*

Uygulama süresi	%7.5 NaOCl				%10 NaOCl				Ortalama
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
7.5 dk	55	50	55	53.33	70	75	70	71.66	62.50 b
10 dk	65	65	60	63.33	75	80	80	78.33	70.83 a
Ortalama				58.33 b				75.00 a	

*Süre ve konsantrasyon için HKO 8.333; LSD 5.592'dir.

Domat çeşidine uygulanan sterilizasyon denemeleri sonucunda yüksek kararma oranları meydana gelmesine rağmen sürgün çıkışları gözlenmiştir. Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%), nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet) ile ilgili veriler Çizelge 4.20; Çizelge 4.21; Çizelge 4.22 ve Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir. Sürgün oluşturan nod eksplantı yüzdesi (%48) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (0.69 adet) en fazla, fungusit ön uygulaması yapılmadan %10'luk NaOCl solüsyonu ile 10dk steril edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Sodyum hipoklorit konsantrasyonu %15 düzeyinde kullanıldığında eksplantlarda daha fazla kararma sorunu ile karşılaşıldığından, bu konsantrasyonda sürgün rejenerasyonu daha az olmuştur. Ayrıca Gemlik çeşidinin aksine Domat çeşidinde sürgün rejenerasyonu daha geç gerçekleşmiştir (3 hafta) ve sürgün çıkışları çoğunlukla mono lateral olmuştur (Şekil 4.13). Fungusit ön uygulaması ile steril edilen nodal eksplantlarının hepsi kararmıştır ve sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.20 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

NaOCl konsantrasyonu	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
%10	12	12	12	12.00	48.00	48.00	48.00	48.00 a
%15	10	9	10	9.67	40.00	36.00	40.00	38.67 b

* Eksplant sayısı tekerrür başına 25 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 2.667; LSD değeri 6.139'dur.

Çizelge 4.21 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

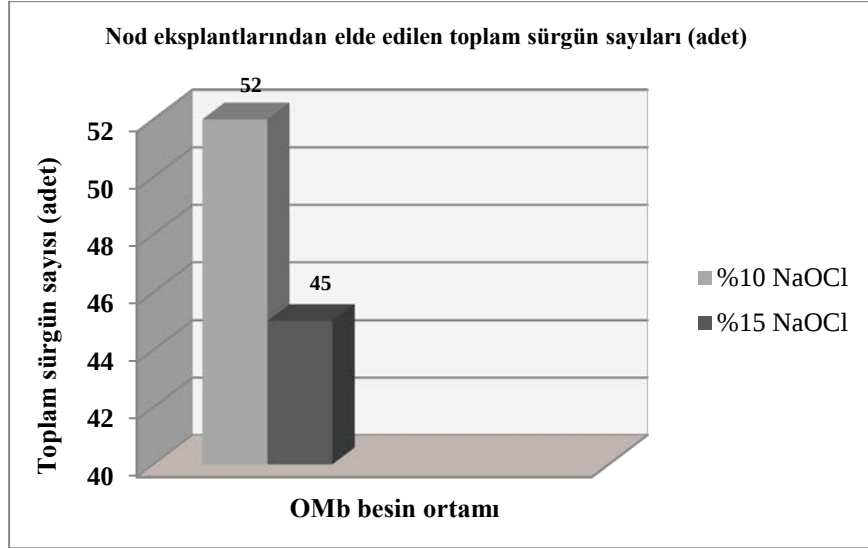
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
NaOCl konsantrasyonu	1	130.667	130.667	49.000**	7.710	21.200
Hata	4	10.667	2.667			
Genel	5	141.333	28.267			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

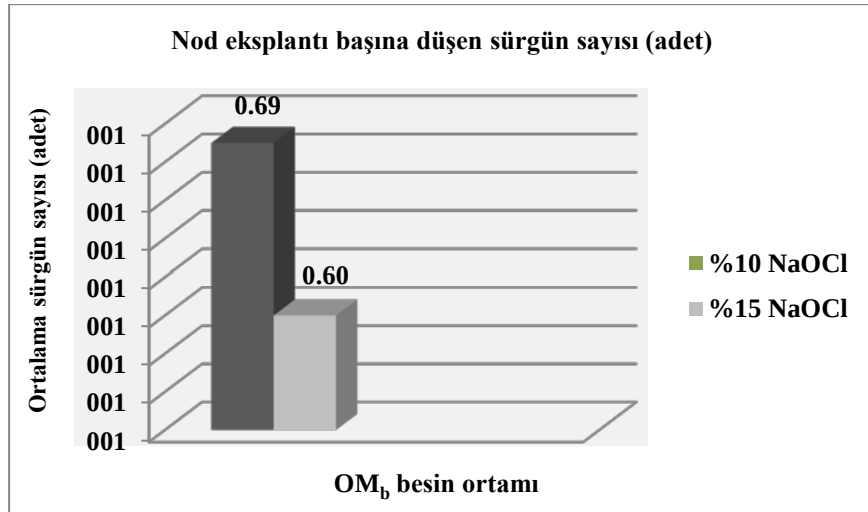
**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

Çizelge 4.22 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15'lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

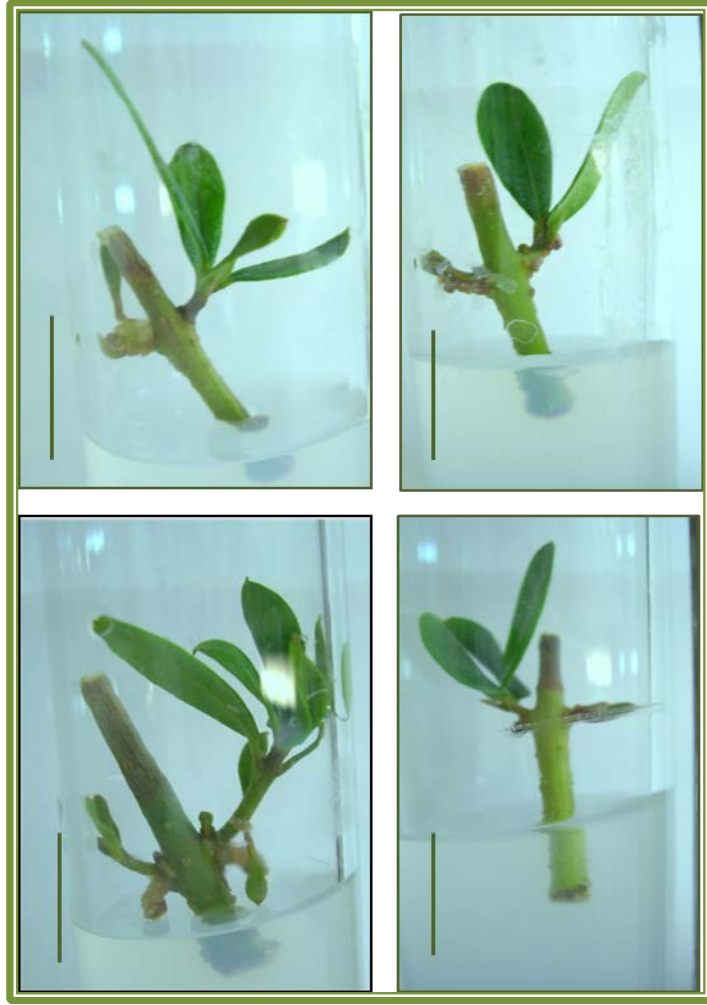
NaOCl konsantrasyonu	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
%10	17	17	18	52	0.68	0.68	0.72	0.69
%15	15	15	15	45	0.6	0.6	0.6	0.60



Şekil 4.11 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



Şekil 4.12 Domat çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların %10 ve %15’lik NaOCl ile 10 dk sterilizasyonu sonucunda 30 gün sonunda OM_b besin ortamında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)



Şekil 4.13 Domat fidanlarından alınan eksplantlardan rejenere olan sürgünler (bar=1cm)

4.2.3 Bahçedeki ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

4.2.3.1 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Arazide yetişen ağaçlardan alınan eksplantlara farklı sürelerde fungusit ön muameleleri (0, 1 saat ve 24 saat) ve NaOCl sterilizasyon uygulamaları olmak üzere 9 değişik deneme yapılmıştır. Bu sterilizasyon uygulamalarına ait içerikler Çizelge 3.4’de sunulmuştur. Yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlara göre fungusit ön muamelesi yapılmayan veya 1 saat süreli fungusit ön muamelesi yapılan eksplantlarda sterilizasyon oranı oldukça düşük olurken, eksplantlara 24 saat süre ile fungusit ön uygulaması yapılması steril eksplant yüzdesini oldukça

arttırmıştır. Eksplantlarda üçüncü günün sonunda küf kontaminasyonları gözlenmeye başlamıştır. Kültüre alındıktan 40 gün sonra elde edilen steril eksplant yüzdeleri Çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4.23 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)

Uygulama	Fungusit ön muamelesi	NaOCl konsantrasyonu	NaOCl uygulama süresi	Steril eksplat yüzdesi (%)			
				T1	T2	T3	Ort.
1	-	%15	10 dk	0.00	0.00	0.00	0.00 g
2			15 dk	6.66	6.66	6.66	6.67 f
3			20 dk	13.33	13.33	20.00	15.55 d
4	1 saat	%15	10 dk	13.33	6.66	13.33	11.10 e
5			15 dk	13.33	20.00	20.00	17.77 d
6			20 dk	26.66	33.33	26.66	28.88 c
7	24 saat	%15	10 dk	86.66	86.66	86.66	86.67 b
8			15 dk	93.33	86.66	93.33	91.10 a
9			20 dk	93.33	93.33	93.33	93.33 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 9.156; LSD değeri 2.73’tür.

Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon uygulamalarının, sterilizasyon başarısı üzerine etkilerini değerlendirmek üzere yapılan istatistiki analizlere göre, uygulamalar arasındaki farklılık %1 seviyede önemli bulunmuştur (Çizelge 4.24). Buna göre, eksplantların 24 saat fungusit ön muamelesine maruz bırakılarak, ardından %15’lik NaOCl ile 15 veya 20 dakika süreyle steril edildikleri uygulamalar sırasıyla %91.10 ve %93.33 sterilizasyon oranları ile ilk grupta yer almıştır (Çizelge 4.24). Fungusit ön muamesi yapılmadan %15’lik NaOCl ile 10 dakika steril edilen eksplantlardan temiz materyal elde edilememiştir.

Çizelge 4.24 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sterilizasyon uygulaması	8	31971.292	3996.411	436.501**	2.640	4.000
Hata	15	137.333	9.156			
Genel	23	32108.625	1396.027			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

4.2.3.2 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara yapılan sterilizasyon uygulamalarında eksplantlar 1 saat veya 24 saat süre ile fungusit ile ön muamele edilmiş veya hiç muamele edilmeden %15'lik NaOCl konsantrasyonunda farklı sürelerde steril edilmişlerdir. Yapılan sterilizasyon uygulamalarına karşılık elde edilen sterilizasyon başarı yüzdeleri Çizelge 4.25'de gösterilmiştir. Sterilizasyon başarısı ile ilgili varyans analiz sonuçları incelendiğinde uygulanan 9 farklı sterilizasyon yönteminin sterilizasyon başarısı üzerine istatistiksel olarak %1 önem düzeyinde etkisi olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.26). Yürütülen denemelere göre en iyi sterilizasyon başarısı (%82.22) 24 saat fungusit ön muamelesinin ardından %15'lik NaOCl solüsyonunda 20 dakikalık sterilizasyon uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)

Uygulama	Fungusit ön muamelesi	NaOCl konsantrasyonu	NaOCl uygulama süresi	Steril eksplat yüzdesi (%)			
				T1	T2	T3	Ort.
1	-	%15	10 dk	0.00	0.00	0.00	0.00 g
2			15 dk	13.33	13.33	6.66	11.10 f
3			20 dk	26.66	26.66	13.33	22.21 e
4	1 saat	%15	10 dk	20.00	20.00	20.00	20.00 e
5			15 dk	53.33	53.33	46.66	51.10 d
6			20 dk	53.33	46.66	53.33	51.10 d
7	24 saat	%15	10 dk	60.00	60.00	60.00	60.00 c
8			15 dk	73.33	73.33	80.00	75.55 b
9			20 dk	80.00	80.00	86.66	82.22 a

* Eksplant sayısı tekrerr başına 15 adettir.

*Testte kullanılan HKO değeri 17.867; LSD değeri 3.22'dir.

Çizelge 4.26 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sterilizasyon uygulaması	8	14653.625	1831.703	102.521**	2.640	4.000
Hata	15	268.000	17.867			
Genel	23	14921.625	648.766			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

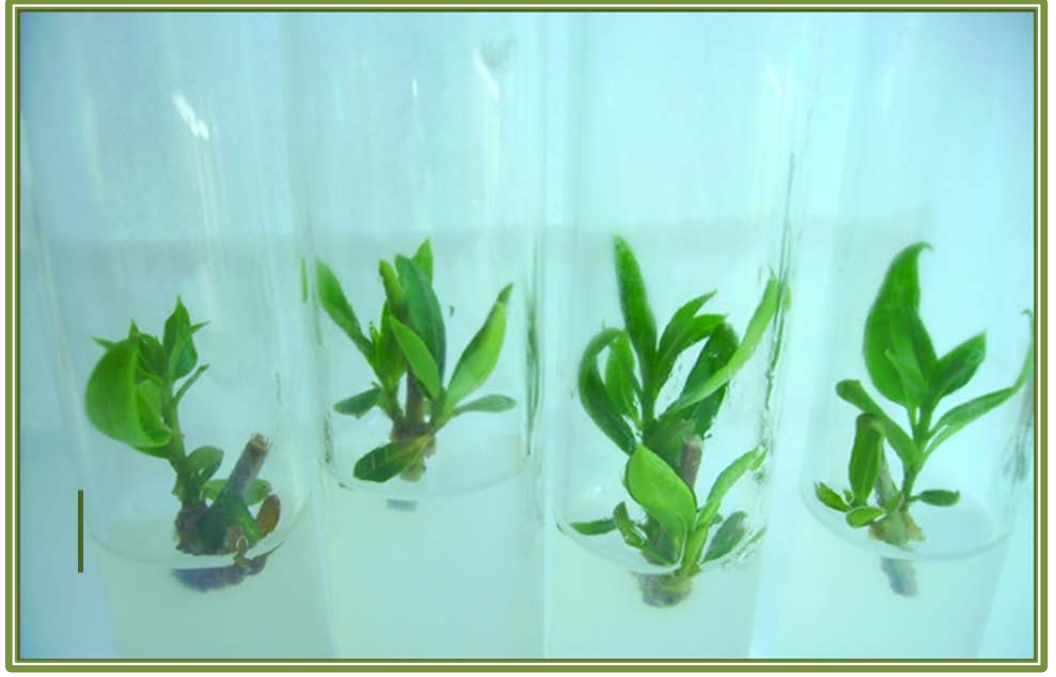
**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

Bu dönem yapılan sterilizasyon denemelerinden Gemlik (% 86.66- % 93.33) ve Domat (% 60.00- % 82.22) çeşitlerine ait ağaçlardan alınan materyallerde 24 saat fungusit ön muameleli sterilizasyon uygulamalarından oldukça yüksek oranlarda steril materyal elde edilmesine rağmen, bu eksplantların hepsinde kararma gözlenmiş ve dolayısıyla hiç sürgün elde edilememiştir.

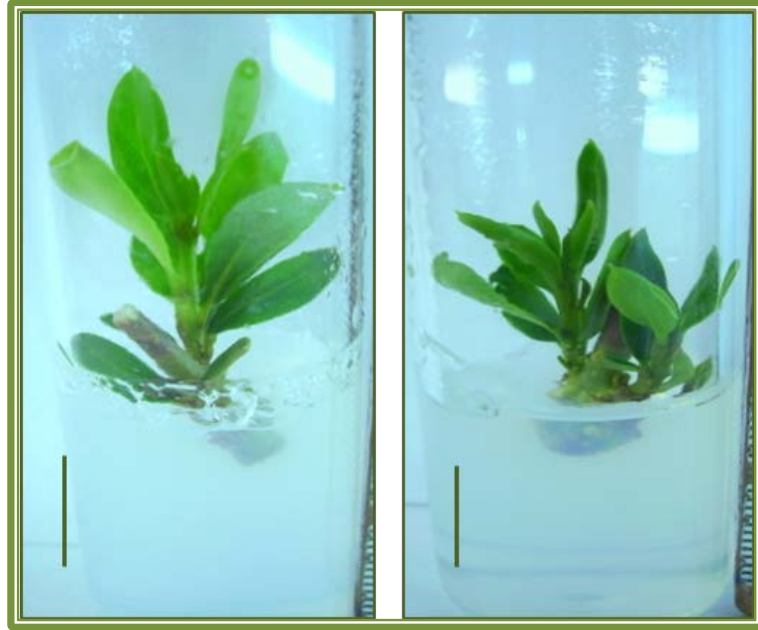
4.3 Ocak-Haziran 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Gemlik ve Domat çeşitlerinde daha önce elde edilen *in vitro* sürgünler sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacıyla 0, 1.0, 2.0 mg/l dozlarında BA, KİN ve ZEA içeren OM_s ve modifiye DKW ortamlarında kültüre alınmışlardır. Ancak sürgünlerin gelişmediği, yapraklarda klorozis, nekrozis ve absisyonun meydana geldiği gözlenmiştir. Bu durumun besin ortamındaki mineral elementlerin eksikliklerinden ya da fazlalıklarından kaynaklandığı düşünülmüş ve Temmuz-Aralık 2009 döneminden elde edilen sürgünler; 2 mg/l zeatin içeren OM_s ortamında (1. Ortam), Britos ve Santos (2009)'un kullandığı konsantrasyonu iki katına çıkarılmış Fe, Mg ve Mn ve 2mg/l zeatin içeren OM_s ortamında (2. Ortam) ve boy artışını teşvik etmek amacı ile KNO₃ konsantrasyonu artırılmış (5 mg/l) OM_s ortamında kültüre alınmışlardır (3. Ortam). Ancak zeatinli ortamın kabinde dökülmesi sırasında meydana gelen bir sorundan dolayı kültürlerde kontaminasyonla karşılaşmıştır. Bu denemeden sağlam kalan *in vitro* sürgünlerin en iyi 3. ortamda geliştiği gözlenmiş ve (Şekil 4.14 ve 4.15) Gemlik çeşidinden sağlam kalan *in vitro* sürgünlerden bir kısmı bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek sadece sürgünü içerecek şekilde bir kısmı da kesilmeden bağlı bulundukları ana dokuyu da içerecek şekilde 3. ortamda kültüre alınmışlardır. Bu şekilde iki farklı eksplantın sürgün gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Domat çeşidinden yeterli sayıda sürgün olmadığından, mevcut olan 18 sürgün ana eksplant dokudan ayrılarak sadece sürgünü içerecek şekilde 3. ortamda kültüre alınmışlardır. Bu ortama aktarılan sürgünlerin, aktarılmadan önceki ve aktarıldıktan 40 gün sonraki boy uzunluk ve yaprak sayısı farkları ile nekrozis ve klorozis gösteren sürgün sayıları da ayrıca belirlenmiştir.

Nodal eksplantlardan elde edilen sürgünlerin ana dokudan ayrılarak kültüre alınması ile ana dokudan ayrılmadan kültüre alınması boy uzunluğu bakımından istatistiki açıdan bir fark yaratmamış, boy uzunluklarında dikkate değer bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.14 Gemlik çeşidinde bağlı bulundukları ana dokudan kesilmeyerek kültüre alınan *in vitro* sürgünlerin potasyumu arttırılmış modifiye OM₃ ortamında (3. Ortam) gelişimi (bar=1cm)

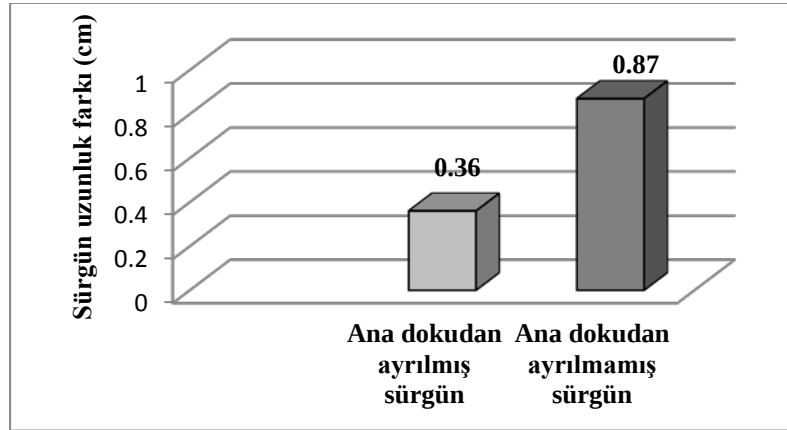


Şekil 4.15 Domat çeşidinde bağlı bulundukları ana dokudan kesilmeyerek kültüre alınan *in vitro* sürgünlerin potasyumu arttırılmış modifiye OM₃ ortamında (3. Ortam) gelişimi (bar=1cm)

Çizelge 4.27 Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış ve ana dokudan ayrılmamış *in vitro* sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm)*

Eksplant tipi	Tekerrür	Sürgünlerin ortalama boy uzunluğu (cm)		
		İlk	Son	Uzunluk farkı
Ana dokudan ayrılmış sürgün	T1	0.79	1.01	0.22
	T2	0.77	1.36	0.59
	T3	0.60	0.86	0.26
	Ortalama	0.72	1.08	0.36
Ana dokudan ayrılmamış sürgün	T1	0.26	1.14	0.88
	T2	0.31	1.45	1.14
	T3	0.26	0.84	0.58
	Ortalama	0.28	1.14	0.87

* Eksplant sayısı tekerrür başına 10 adettir.



Şekil 4.16 Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm)

Sürgünlerde meydana gelen yaprak sayısındaki artış, kullanılan eksplant tipine bağlı olarak yapılan istatistik analizlere göre %5 seviyesinde önemli bulunmuştur. Buna göre, sürgün başına ortalama yaprak sayısındaki artış ana dokudan ayrılmayan sürgünlerde 4.43 adet, ana dokudan ayrılan sürgünlerde 1.05 adet olmuştur (Çizelge 4.28; Çizelge 4.29). Yaprakların morfolojik görünüşleri incelendiğinde özellikle sürgün uçlarına yakın kısımlarda yaprak nekrozları ve klorozları ile karşılaşılmış ve yaprakların içe doğru kıvrık olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Çizelge 4.28 Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet), yapraklarda nekroz ve kloroz gözlenen sürgün sayısı * (adet)**

Eksplant tipi	Tekerrür	Sürgün başına ortalama yaprak sayısı (adet)			Yapraklarda nekroz gözlenen sürgün sayısı	Yapraklarda kloroz gözlenen sürgün sayısı
		İlk	Son	Yaprak sayısı farkı		
Ana dokudan ayrılmış sürgün	T1	4.85	5.14	0.29	3.00	-
	T2	3.43	5.00	1.57	2.00	2.00
	T3	3.14	4.43	1.29	4.00	-
	Ortalama	3.81	4.86	1.05 b	3.00	0.67
Ana dokudan ayrılmamış sürgün	T1	2.75	6.55	3.80	3.00	1
	T2	2.45	8.80	6.35	3.00	0
	T3	2.55	5.70	3.15	3.00	1
	Ortalama	2.58	7.02	4.43 a	3.00	0.67

* Eksplant sayısı tekerrür başına 10 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 1.657; LSD değeri 2.918'dir.

Çizelge 4.29 Gemlik çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgün ve ana dokudan ayrılmamış sürgünlerin 3 no'lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Eksplant tipi	1	17.170	17.170	10.363*	7.710	21.200
Hata	4	6.627	1.657			
Genel	5	23.798	4.760			

ns=not significant (önemsiz)

*= α :0,05 önemlilik düzeyi

**= α :0,01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.17 Potasyumu artırılmış 3 no’lu ortamda kültüre alınan Gemlik sürgünlerinde gözlenen (a) klorozis (b) yaprak kıvrılmaları (bar=1 cm)

Domat çeşidinde kullanılan sürgünler ana dokudan ayrılarak 3 no’lu besin ortamında kültüre alınmış fakat boy uzunluğu ve yaprak sayısı artışı bakımından önemli farklılıklar gözlenmemiştir (Çizelge 4.30 ve Çizelge 4.31). Gemlik çeşinde olduğu gibi nekrozis, klorozis ve yaprak kıvrılma durumlarına rastlanmıştır.

Çizelge 4.30 Domat çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgünlerin 3 no’lu besin ortamına transferinden 40 gün sonraki sürgün uzunluk farkları (cm)*

Tekerrür	Sürgünlerin ortalama boy uzunluğu (cm)		
	İlk	Son	Uzunluk farkı
T1	0.96	1.01	0.05
T2	0.93	1.02	0.09
T3	0.75	0.83	0.08
Ortalama	0.88	0.95	0.07

* Eksplant sayısı tekerrür başına 6 adettir.

Çizelge 4.31 Domat çeşidinde ana dokudan ayrılmış sürgünlerin 3. besin ortamına transferinden 40 gün sonraki yaprak sayısı farkı (adet), yapraklarda nekroz ve kloroz gözlenen sürgün sayısı (adet)*

Tekerrür	Sürgün başına ortalama yaprak sayısı (adet)			Yapraklarda nekroz gözlenen sürgün sayısı (adet)	Yapraklarda kloroz gözlenen sürgün sayısı (adet)
	İlk	Son	Yaprak sayısı farkı		
T1	3.50	4.00	0.50	5	-
T2	2.66	3.66	1.00	5	-
T3	3.00	3.16	0.16	5	-
Ortalama	3.05	3.61	0.55	5	-

* Eksplant sayısı tekerrür başına 6 adettir.

4.4 Temmuz-Aralık 2010 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Fidanların zeytin güvesinden zarar görmesinden dolayı fidanlardan eksplant alınamamış ve bahçede bulunan ağaçlardan materyal alınıp sterilizasyon prosedürü optimize edilmeye çalışılmıştır. Ağaçlarda sterilizasyon prosedürünün oturtulması ile eksplant alınacak donör bitki sayısının artırılması ve daha fazla deneme kurma şansı yakalanması hedeflenmiştir. Bu amaçla Temmuz-Aralık 2009 döneminde bahçede yetişen Gemlik ve Domat çeşidinde sterilizasyon prosedürünün belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu denemelerde yüksek oranda steril materyal elde edilmesine rağmen kararmalardan dolayı sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Yüksek kararma oranlarının uygulanan ağır sterilizasyon prosedürlerinden kaynaklandığı düşünüldüğünden farklı sterilizasyon yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır ve her iki çeşit için Çizelge 3.5’de belirtilen 14 uygulama yapılmıştır. Bir ay sonra elde edilen veriler istatistiki açıdan değerlendirilmiştir.

4.4.1 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Bahçede bulunan Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara farklı sterilant maddeler ile farklı sürelerde 14 sterilizasyon prosedürü uygulanmış ve bu sterilizasyon uygulamalarına ait içerikler Çizelge 4.32’de sunulmuştur. Yapılan

denemeler istatistiki açıdan değerlendirildiğinde sterilizasyon uygulamalarının sterilizasyon başarısı üzerine etkileri önemli bulunmuştur (%1 önem seviyesinde) (Çizelge 4.33).

Yapılan sterilizasyon uygulamaları değerlendirildiğinde Gemlik çeşidi için en fazla steril eksplant (%66.67); eksplantların 24 saat fungusit ile (1.5 g/l CAPTAN+1.5 g/l BENOLEX) muamele edildikten sonra, %10'luk etil alkolde 15 dakika steril edilip 3 ml/l PPM içeren besin ortamlarına aktarıldığı sterilizasyon uygulamasından (14. uygulama), en az steril eksplant ise (%6.67); %10'luk NaOCl'de 15 dakika sterilizasyondan sonra eksplantların 1ml/l ppm içeren besin ortamlarına aktarıldığı sterilizasyon uygulamasından (9. uygulama) elde edilmiştir (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.32 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)**

Uygulama	Steril eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	13.33	13.33	6.67	11.00 fg
2	20.00	20.00	13.33	17.78 f
3	13.33	13.33	6.67	11.00 fg
4	40.00	40.00	33.33	37.78 de
5	46.67	46.67	40.00	44.44 bcd
6	33.33	33.33	33.33	33.33 e
7	46.67	40.00	40.00	42.22 cd
8	46.67	46.67	40.00	44.44 bcd
9	6.67	6.67	6.67	6.67 g
10	46.67	46.67	40.00	44.44 bcd
11	46.67	46.67	46.67	46.67 bc
12	13.33	13.33	13.33	13.33 fg
13	53.33	53.33	46.67	51.00 b
14	66.67	66.67	66.67	66.67 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 10.308; LSD değeri 7.284'tür.

Çizelge 4.33 Gemlik çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sterilizasyon uygulaması	13	11900.975	915.460	88.813**	2.133	2.929
Hata	26	268.000	10.308			
Genel	39	12168.975	312.025			

* = α :0,005 önemlilik düzeyi

* * = α :0,001 önemlilik düzeyi

4.4.2 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar

Domat çeşidinde ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerinin, sterilizasyon başarısı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmadan elde edilen veriler Çizelge 4.34’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiki analizlere göre uygulamalar arasındaki farklılık %1 seviyede önemli bulunmuştur (Çizelge 4.35). Buna göre, eksplantların 24 saat fungusit ön muamelesine maruz bırakılarak, ardından %10’luk NaOCl ile 15 dakika süreyle steril edildikleri ve en son olarak 3 ml/l PPM içeren besin ortamına aktarıldıkları uygulama (14. uygulama) en yüksek sterilizasyon oranını (%55.56) vererek ilk grupta yer almıştır (Çizelge 4.34). 24 saat fungusit ön uygulamasından sonra pH’ı 7’ye ayarlanmış %10 luk NaOCl ile eksplantların 10 veya 15 dakika süre ile steril edildiği 3. ve 4. uygulamalardan steril eksplant elde edilememiştir.

Hem Gemlik, hem de Domat çeşidi için 1.-8. sterilizasyon uygulamalarından elde edilen steril eksplantlarda kararmaların oldukça fazla olduğu gözlenmiş ve sürgün çıkışı görülmemiştir. Aynı şekilde 9.-14. sterilizasyon uygulamalarından elde edilen steril eksplantların çoğu 2. hafta itibarıyla hala yeşil olmasına rağmen daha sonra kararmalar başlamış ve giderek sağlıklı kalan eksplantların hepsi kararmıştır. Besin ortamına ppm’in eklendiği uygulamalarda kontaminasyon diğer uygulamalara göre daha geç görülmüştür.

Çizelge 4.34 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%)**

Uygulama	Steril eksplant yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	20.00	13.33	13.33	15.56 cd
2	33.33	33.3	40.00	35.56 b
3	0.00	0.00	0.00	0.00 f
4	0.00	0.00	0.00	0.00 f
5	6.67	6.67	6.67	6.67 ef
6	20.00	20.00	20.00	20.00 c
7	20.00	20.00	20.00	20.00 c
8	33.33	26.67	26.67	28.89 b
9	6.67	6.67	6.67	6.67 ef
10	13.33	13.33	6.67	11.00 de
11	20.00	20.00	20.00	20.00 c
12	6.67	6.67	6.67	6.67 ef
13	13.33	13.33	13.33	13.33 cde
14	60.00	53.33	53.33	55.56 a

*Eksplant sayısı tekrerr başına 15 adettir.

*Testte kullanılan HKO değeri 9.125; LSD değeri 7.204'tür

Çizelge 4.35 Domat çeşidine ait ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon denemelerinden elde edilen bulgulara göre steril eksplant yüzdeleri* (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sterilizasyon uygulaması	13	5453.200	419.477	45.970**	2.405	3.519
Hata	16	146.000	9.125			
Genel	29	5599.200	193.076			

* = α :0,005 önemlilik düzeyi

* * = α :0,001 önemlilik düzeyi

4.5 Ocak-Haziran 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.5.1 Nod kültürü denemeleri

Gemlik ve Domat çeşitlerine ait ağaçlardan alınan eksplantlara yapılan sterilizasyon denemelerinde steril eksplant yüzdesi artmasına rağmen, şimdiye kadar yapılan tüm denemelerde kararma problemi ile karşılaşmış ve sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Bu nedenle tekrar fidan temini yoluna gidilmiş ve fidanlardan alınan nodlardan kurulacak denemeler için öncelikle temel besin ortamının belirlenmesi yoluna gidilmiştir. Nod kültürleri için Çizelge 3.6'da belirtilen besin ortamları kullanılmış ve kültürlerden 30 gün sonra elde edilen sonuçlar değerlendirilerek her bir çeşit için ayrı ayrı sunulmuştur.

4.5.1.1 Gemlik çeşidine ait fidanlardan kurulan nod kültürü denemelerinden elde edilen sonuçlar

Nod kültürleri için uygun temel besin ortamının belirlenmesi amacıyla yapılan denemede 5 farklı besin ortamı kullanılmış ve kültüre alınan eksplantlarda her ortam için sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%) ve kararan eksplant yüzdeleri (%) belirlenmiş ve veriler Çizelge 4.36'da gösterilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmede, besin ortamının sürgün oluşumu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.37). Buna göre, en fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%97.78) WPM besin ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir (Çizelge 4.36).

Çizelge 4.36 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

Besin ortamı		Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	OM _b	6	6	7	6.33	40.00	40.00	46.67	42.22 c
2	DKW	2	1	2	1.67	13.33	6.67	13.33	11.11 d
3	OM _s	10	10	12	10.67	66.67	66.67	80.00	71.11 b
4	WPM	14	15	15	14.67	93.33	100	100	97.78 a
5	Modifiye OM _s	1	1	1	1.00	6.67	6.67	6.67	6.67 d

* Eksplant sayısı tekrerrür başına 15 adettir.

** Testte kullanılan HKO değeri 20.200; LSD değeri 11.628'dir.

Çizelge 4.37 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	18211.733	4552.933	225.393**	3.480	5.990
Hata	10	202.000	20.200			
Genel	14	18413.733	1315.267			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

Denemelerde kullanılan besin ortamlarının sürgün rejenerasyonu yanında kararma üzerine de oldukça etkili olduğu gözlenmiş ve bu konuda yapılan incelemeler Çizelge 4.38'de ifade edilmiştir. Çizelge 4.38'de de görüldüğü gibi kararan eksplant yüzdelерinin %0.00 ile %82.22 arasında büyük bir varyasyon gösterdiği dikkati çekmektedir. İstatistiki hesaplamalara göre; besin ortamlarının kararma üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.39). Veriler değerlendirildiğinde, en fazla kararmaya neden olan besin ortamının (%82.22) DKW olduğu ortaya çıkmıştır. Bu ortamı yine tuz içeriği yüksek olan modifiye OM_s ortamı (%53.33) takip etmektedir. WPM besin ortamında hiç kararma gözlenmemiştir (Çizelge 4.38) ve bundan sonra Gemlik çeşidinde yapılacak çalışmalarda bu besin ortamının kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.38 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%)**

Besin Ortamı	Gemlik çeşidinde kararan eksplant yüzdeleri (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	33.33	40.00	26.66	33.33 c
2	80.00	86.67	80.00	82.22 a
3	13.33	20.00	13.33	15.55 d
4	0.00	0.00	0.00	0.00 e
5	53.33	53.33	53.33	53.33 b

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 21.185; LSD değeri 13.154'tür.

Çizelge 4.39 Gemlik çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	7360.019	1840.005	86.853**	4.120	7.850
Hata	7	148.296	21.185			
Genel	11	7508.315	682.574			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

4.5.1.2 Domat çeşidine ait fidanlardan kurulan nod kültürü denemelerinden elde edilen sonuçlar

Domat çeşidinde 5 farklı besin ortamında kültüre alınan nodal eksplantlarda oldukça fazla kararma problemi ile karşılaşıldığından sürgün rejenerasyonu meydana gelmemiştir ve kararma yüzdeleri ile ilgili bilgiler Çizelge 4.40'da verilmiştir. Besin ortamlarının kararma üzerine etkisi %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.41). En fazla kararma (%100) ise aynı grupta yer alan DKW, OM_s ve modifiye OM_s besin ortamlarında gözlenmiştir (Çizelge 4.40). Domat çeşidi ile bundan sonra yapılacak çalışmalarda kararmanın en az (%60.00) gözleendiği OM_b ortamı kullanılacaktır.

Çizelge 4.40 Domat çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri* (%)**

Besin Ortamı	Domat çeşidinde kararan eksplant yüzdeleri (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	66.66	60.00	53.33	60.00
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	73.33	86.67	53.33	71.11
5	100	100	100	100

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 65.170 ; LSD değeri 20.887'dir.

Çizelge 4.41 Domat çeşidinde 5 temel besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda gözlenen kararma yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	4457.224	1114.306	17.098**	3.480	5.990
Hata	10	651.704	65.170			
Genel	14	5108.927	364.923			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

4.5.2 Meristem kültürü denemesinden elde edilen sonuçlar

Yarı katı OM_b ortamında kültüre alınan meristemlerde her iki çeşitte de 1 hafta içinde kararmalar başlamış ve 30 gün sonunda eksplantların hepsi karardığından sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.18 Yarı katı OM_b ortamında kültüre alınan meristemde gözlenen kararma

4.6 Temmuz-Aralık 2011 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.6.1 Nod kültürü denemeleri

Gemlik ve Domat çeşitlerinde nod kültürlerinden sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacı ile bu çeşitlere ait fidanlardan alınan nod eksplantları 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l dozlarında zeatin içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kurulan nod kültürü denemelerine ilişkin 45 günlük veriler aşağıda sunulmuştur.

4.6.1.1 Gemlik çeşidine ait fidanlardan kurulan nod kültürü denemelerinden elde edilen sonuçlar

Farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında oluşturulan nod kültürlerinde; sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%) (Çizelge 4.42 ve Şekil 4.19; Şekil 4.20), nod eksplantlarından elde edilen

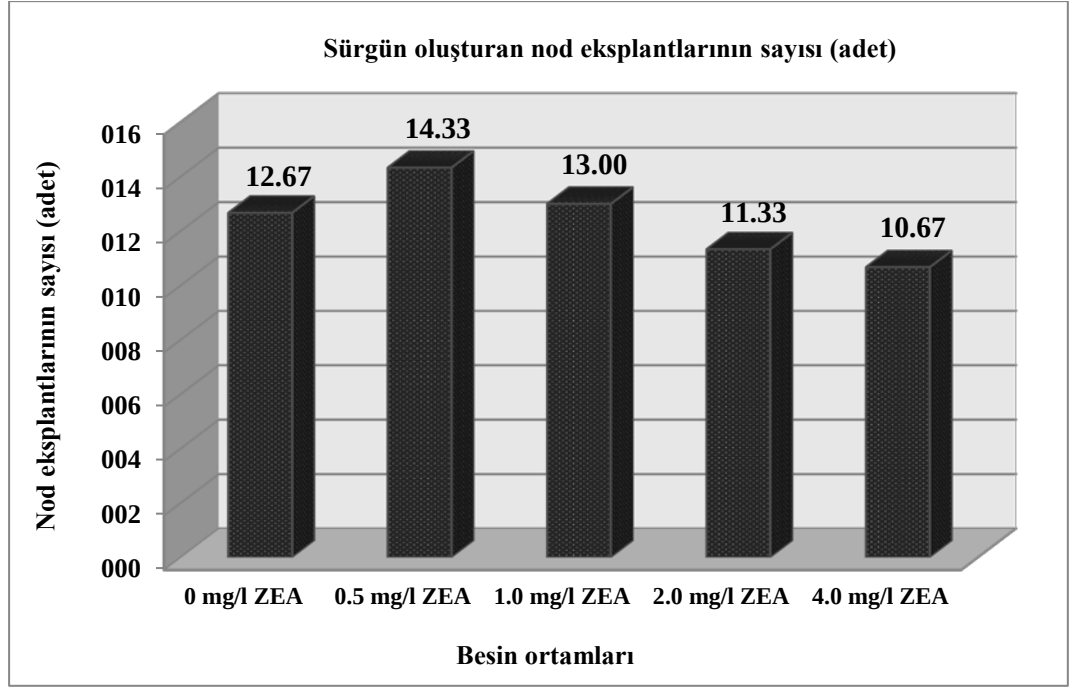
toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) (Çizelge 4.43 ve Şekil 4.21; Şekil 4.22), elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm) (Çizelge 4.44 ve Şekil 4.23), elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet), elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm) (Çizelge 4.45 ve Şekil 4.24; Şekil 4.25), sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%) (Çizelge 4.46) gibi parametreler incelenmiştir.

Sürgün oluşturan nod eksplantı yüzdesi bakımından yapılan istatistiki incelemede kullanılan zeatin konsantrasyonlarının bu parametreler üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%93.33) en fazla 0.5 mg/l ZEA içeren besin ortamında, en düşük ise (%71.11) 4.0 mg/l ZEA içeren besin ortamında saptanmıştır (Çizelge 4.42 ve Şekil 4.19).

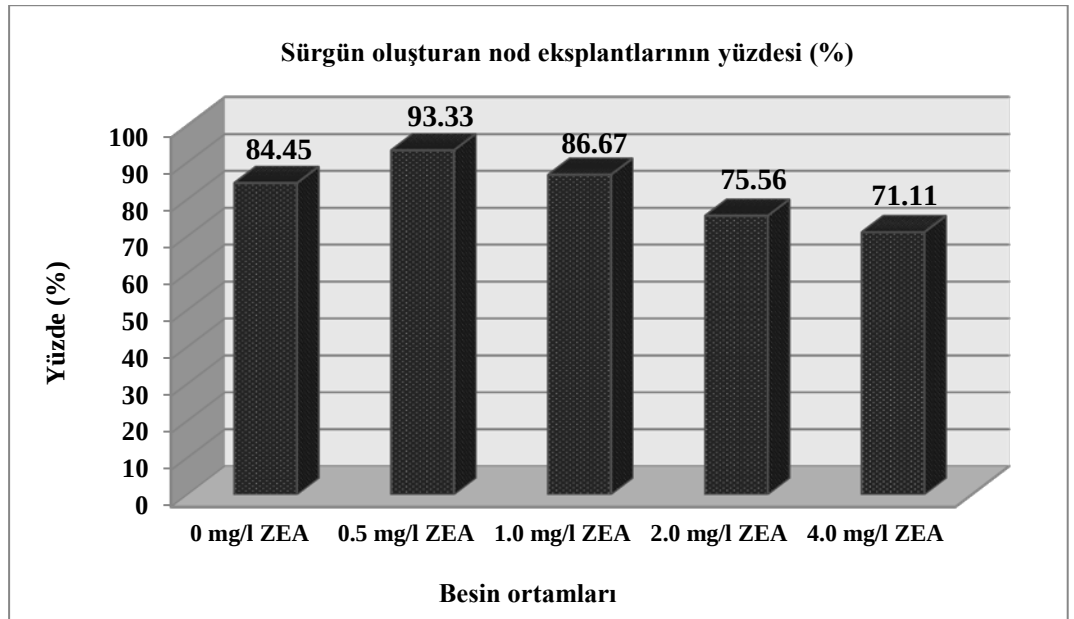
Çizelge 4.42 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)

Besin ortamı	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	13	12	13	12.67	86.67	80.00	86.67	84.45
2	15	13	14	14.33	100	86.67	93.33	93.33
3	11	15	13	13.00		100	86.67	86.67
4	9	12	13	11.33	60.00	80.00	86.67	75.56
5	11	11	10	10.67	73.33	73.33	66.67	71.11

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.



Şekil 4.19 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)



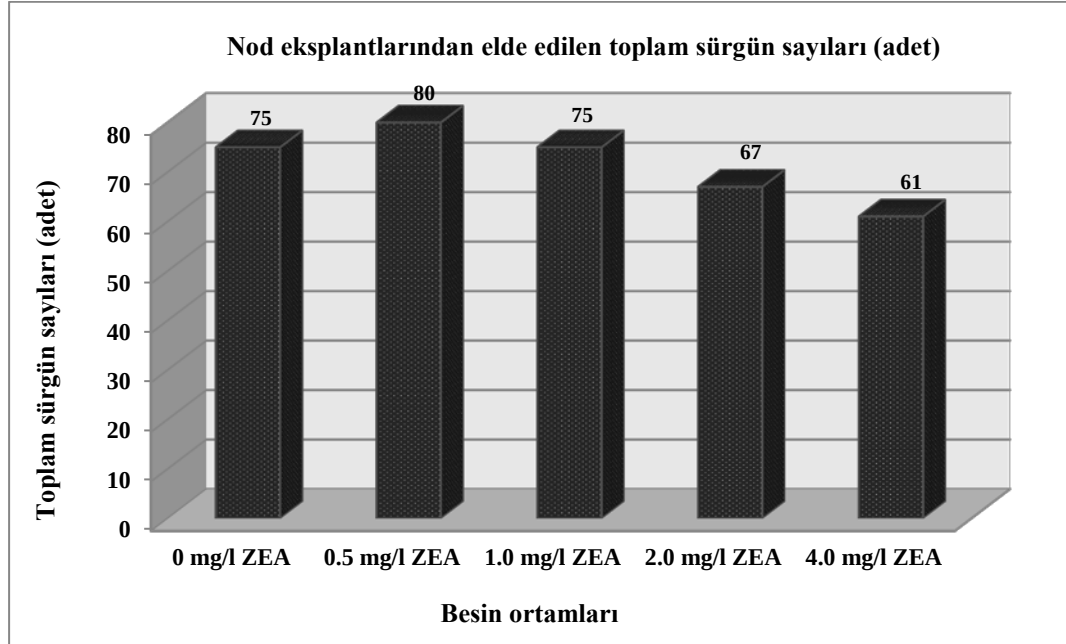
Şekil 4.20 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)

Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarının nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) üzerine etkileri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı

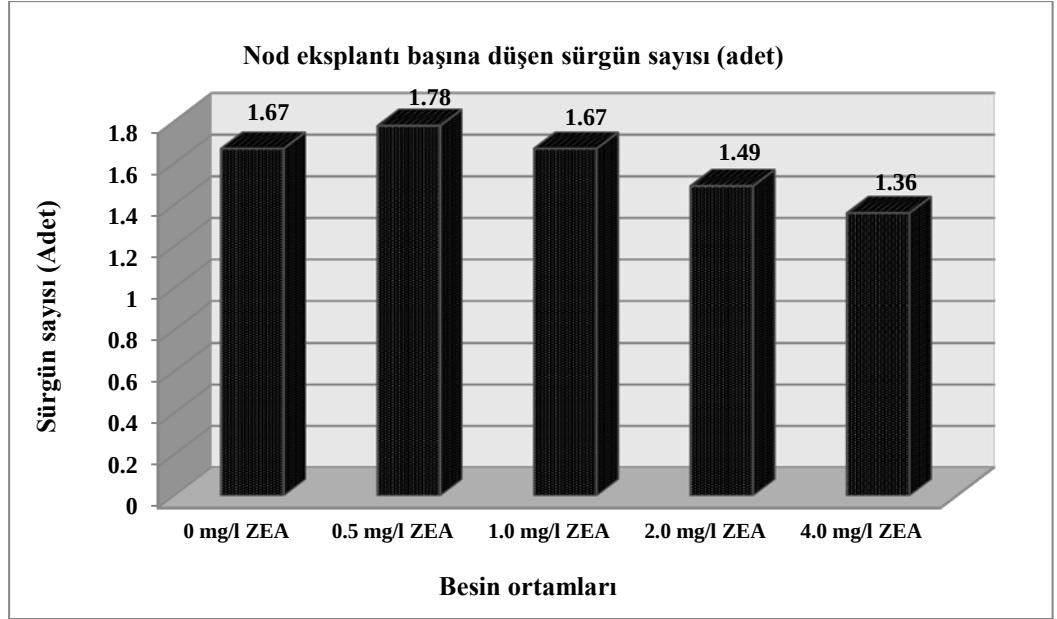
(1.78 adet) 0.5 mg/l ZEA içeren besin ortamından, en düşük sürgün sayısı (1.36 adet) ise 4 mg/l ZEA içeren besin ortamında elde edilmiştir. Zeatin içermeyen kontrol ortamı ile 1.0 mg/l ZEA içeren besin ortamlarında aynı sayıda (1.67) eksplant başına sürgün sayısı oluşmuştur (Çizelge 4.43 ve Şekil 4.22).

Çizelge 4.43 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Besin ortamı	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
1	25	24	26	75	1.67	1.60	1.73	1.67
2	29	25	26	80	1.93	1.67	1.73	1.78
3	21	29	25	75	1.40	1.93	1.67	1.67
4	17	24	26	67	1.13	1.60	1.73	1.49
5	21	21	19	61	1.40	1.40	1.27	1.36



Şekil 4.21 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)

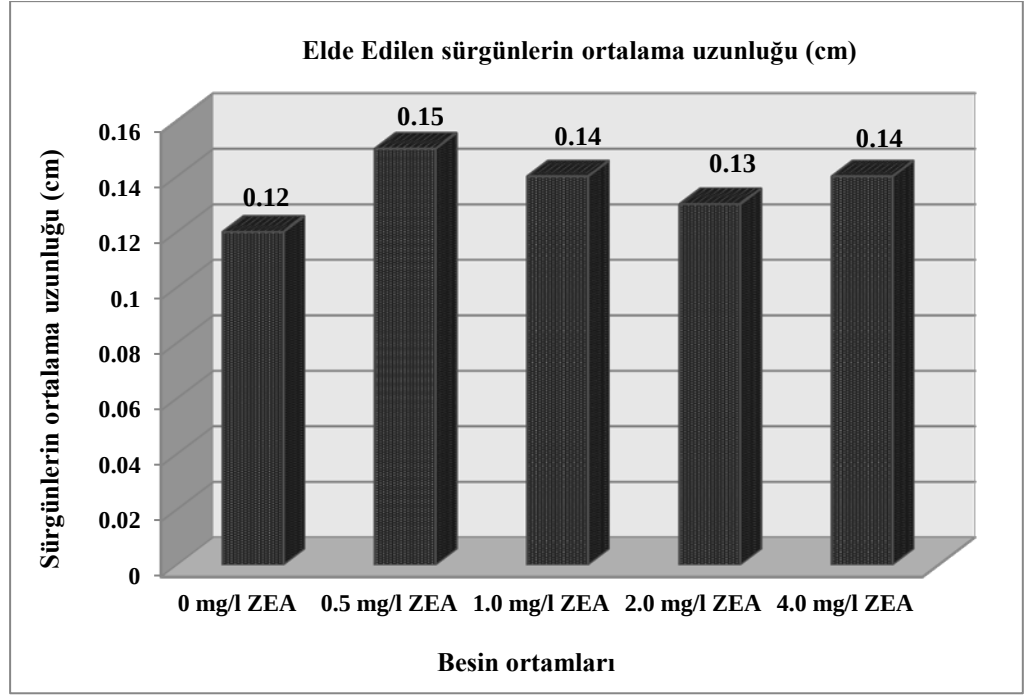


Şekil 4.22 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Kullanılan besin ortamlarının elde edilen sürgünlerin boyları (cm), yaprak sayısı (adet) ve yaprak boyu (cm) üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.44; Çizelge 4.45 ve Şekil 4.23; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Çizelge 4.44 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)

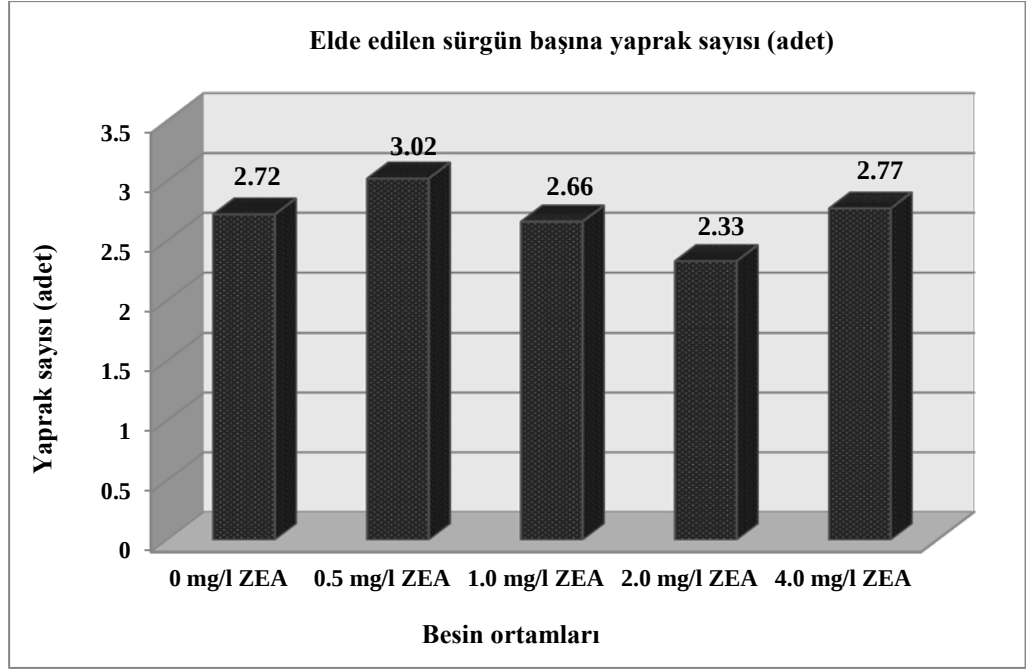
Besin ortamı	Elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)			
	T1	T2	T3	Ort.
1	0.136	0.128	0.110	0.12
2	0.173	0.136	0.143	0.15
3	0.121	0.163	0.125	0.14
4	0.142	0.140	0.117	0.13
5	0.150	0.111	0.146	0.14



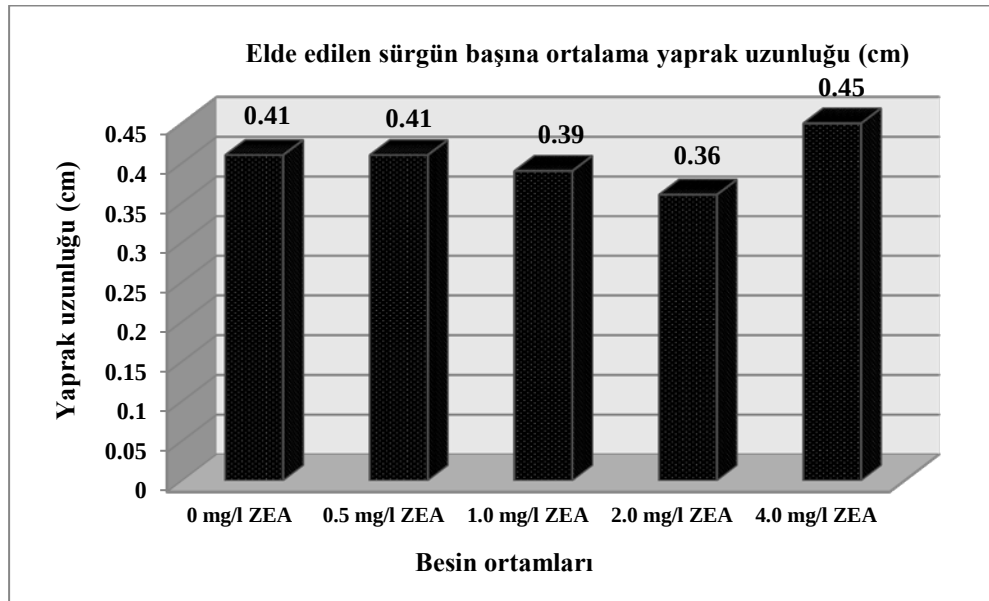
Şekil 4.23 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)

Çizelge 4.45 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet) ve ortalama yaprak uzunluğu (cm)

Besin ortamı	Elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)				Elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
1	3.03	2.29	2.85	2.72	0.41	0.38	0.43	0.41
2	3.07	2.96	3.03	3.02	0.43	0.38	0.41	0.41
3	2.68	3.13	2.17	2.66	0.39	0.43	0.36	0.39
4	2.29	2.40	2.29	2.33	0.37	0.34	0.38	0.36
5	2.86	2.61	2.85	2.77	0.5	0.41	0.43	0.45



Şekil 4.24 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)



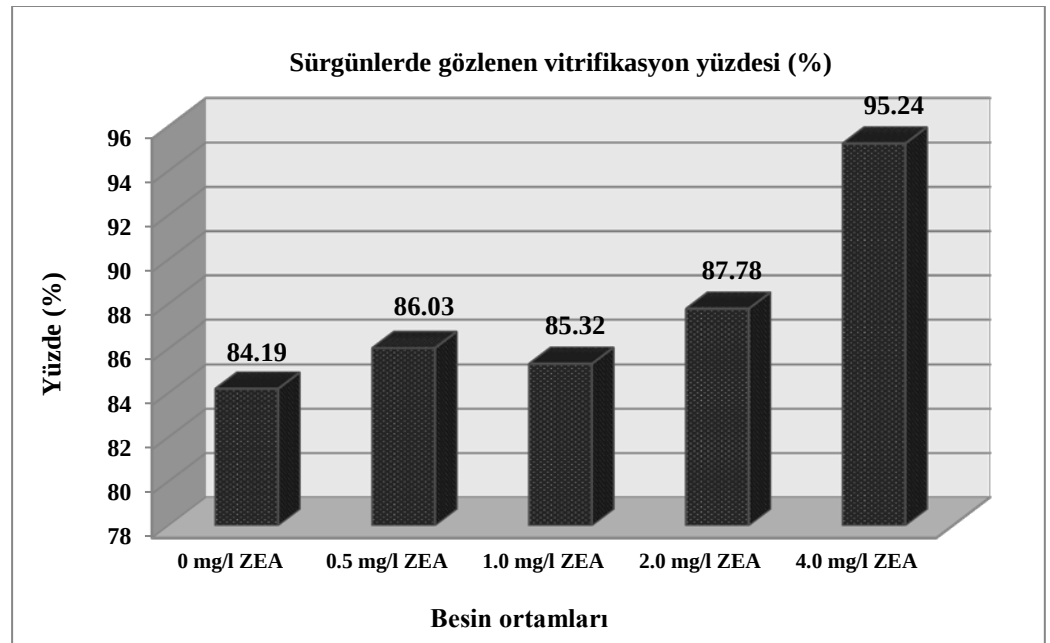
Şekil 4.25 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm)

Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan elde edilen sürgünlerin çoğunda vitrifikasyon gözlenmiştir ve zeatin konsantrasyonlarının vitrifikasyon üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. Elde edilen sürgünlerde en fazla vitrifikasyon oranı

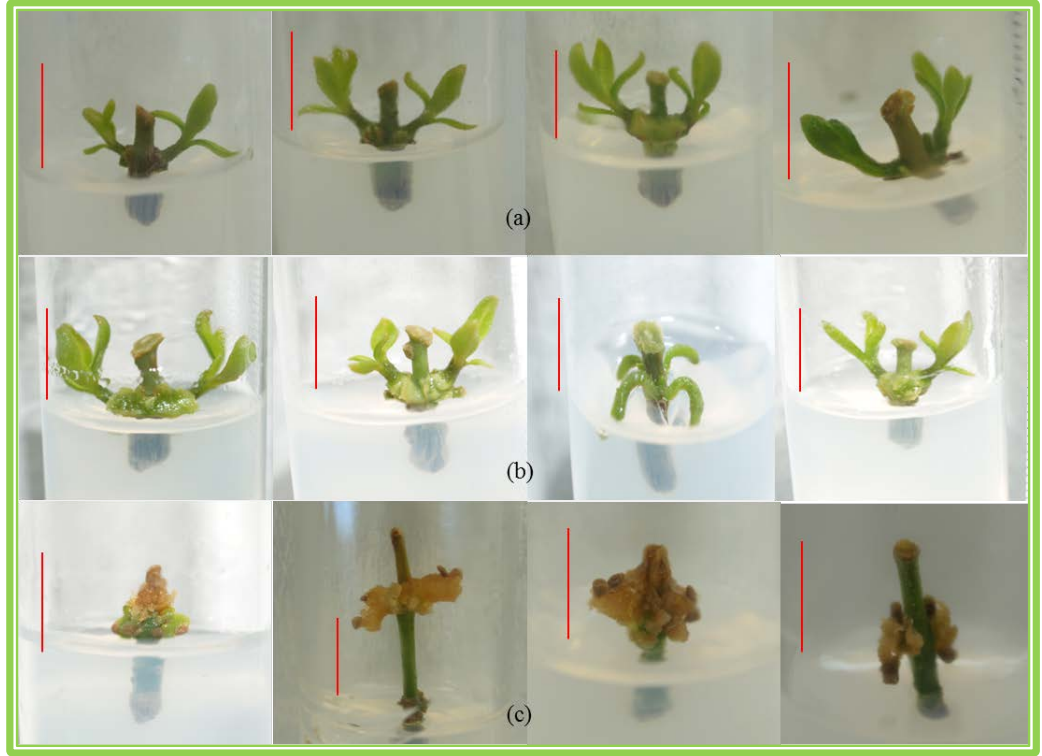
(%95.24) 4 mg/l ZEA içeren besin ortamında, en düşük vitrifikasyon oranı ise (%84.19) bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen WPM ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.46 ve Şekil 4.26). Vitrifikasyonun yanında hemen hemen her eksplanтта petiol bölgelerinin gövde kısmına bağlı bölgelerinde kallus oluşumları da gözlenmiştir (Şekil 4.27).

Çizelge 4.46 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)

Besin ortamı	Sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.
1	84.62	83.33	84.62	84.19
2	85.71	85.71	86.67	86.03
3	85.71	93.33	76.92	85.32
4	83.33	93.33	86.67	87.78
5	85.71	100	100	95.24



Şekil 4.26 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)



Şekil 4.27 Gemlik çeşidinde ZEA içeren besin ortamlarında nodal eksplantlardan rejenere olan (a) normal sürgünler (b) vitrifikasyon gösteren sürgünler (c) kallus oluşturan eksplantlar (bar=1cm)

4.6.1.2 Domat çeşidine ait fidanlardan kurulan nod kültürü denemelerinden elde edilen sonuçlar

Domat çeşidine ait fidanlardan alınan nod eksplantları sürgün rejenerasyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmış ve sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%) (Çizelge 4.47), nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) (Çizelge 4.48) ve sürgünlerde gözlenen kararma yüzdesi (%) (Çizelge 4.49) gibi parametreler belirlenmiştir.

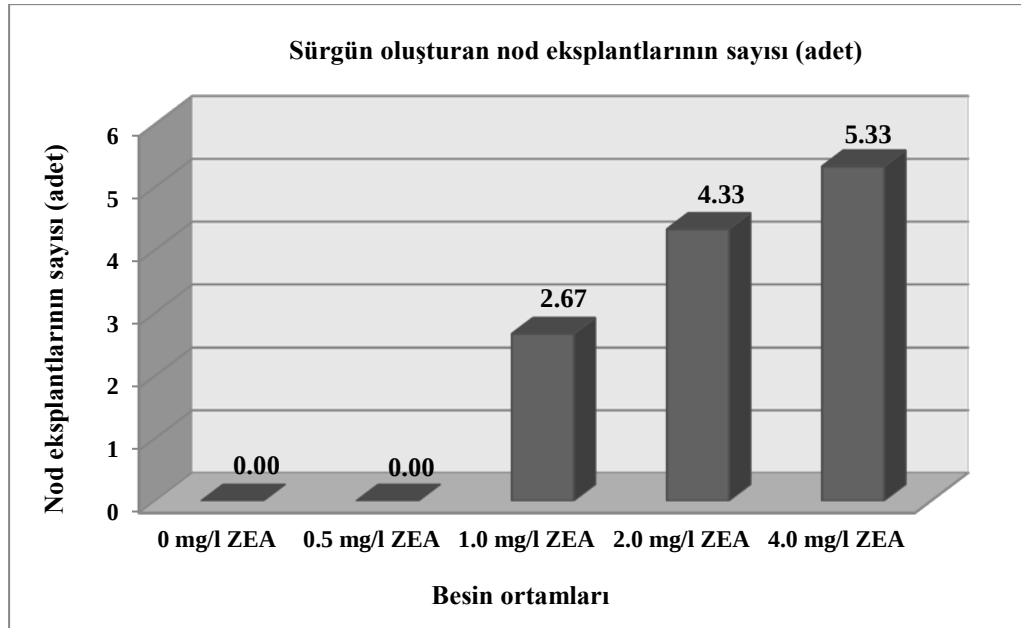
Yapılan istatistiki analize göre sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%), eksplant başına oluşan sürgün sayısı (adet) üzerine besin ortamlarının etkisi önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%35.55), en fazla 4 mg/l ZEA eklenen ortamda elde edilmiştir (Çizelge 4.47 ve Şekil 4.28 ve 4.29). Aynı şekilde nod eksplantlarının oluşturduğu toplam sürgün sayıları (26) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (0.58 adet) en fazla

4 mg/l zeatin içeren besin ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.48 ve Şekil 4.30; Şekil 4.31).

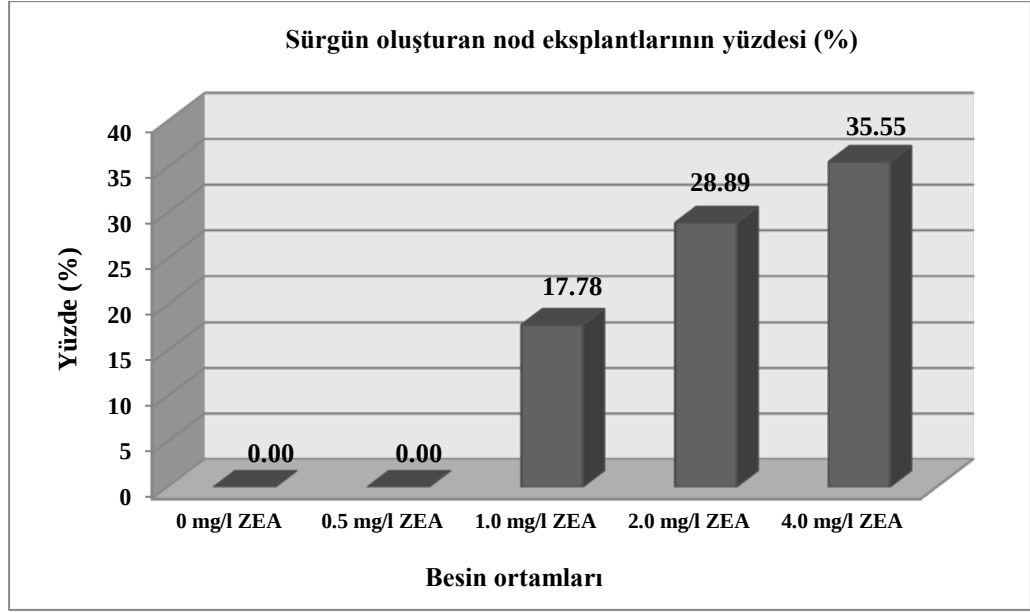
Çizelge 4.47 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Besin ortamı	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	3	3	2	2.67	20.00	20.00	13.33	17.78
4	4	5	4	4.33	26.67	33.33	26.67	28.89
5	6	5	5	5.33	40.00	33.33	33.33	35.55

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.



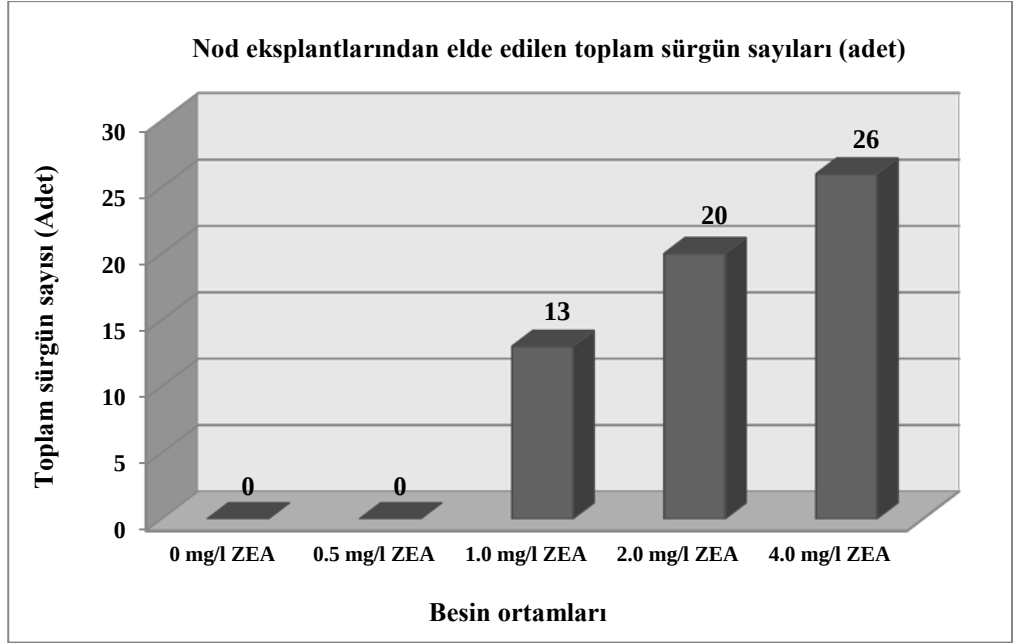
Şekil 4.28 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)



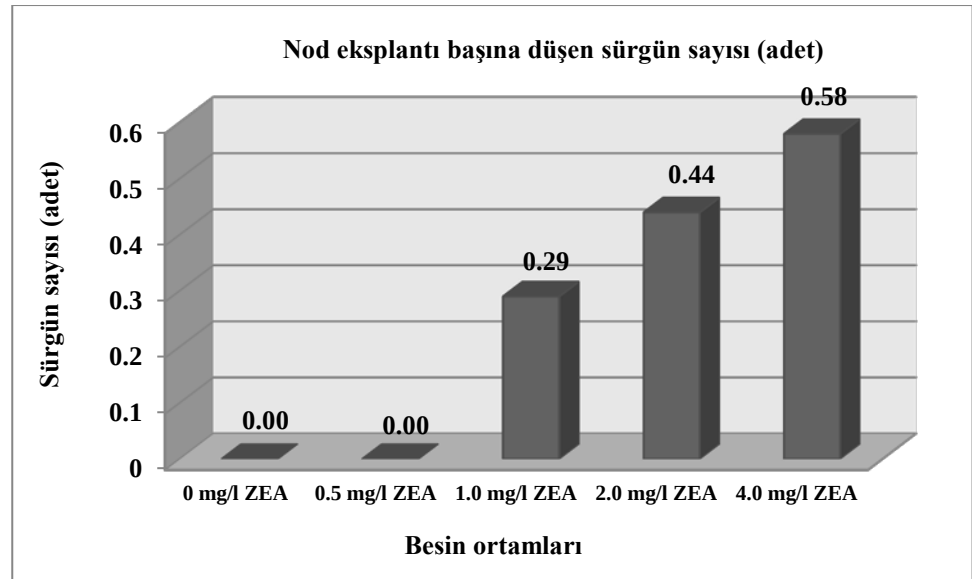
Şekil 4.29 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)

Çizelge 4.48 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Besin ortamı	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
1	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	5	5	3	13	0.33	0.33	0.20	0.29
4	6	8	6	20	0.40	0.53	0.40	0.44
5	10	8	8	26	0.67	0.53	0.53	0.58



Şekil 4.30 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)

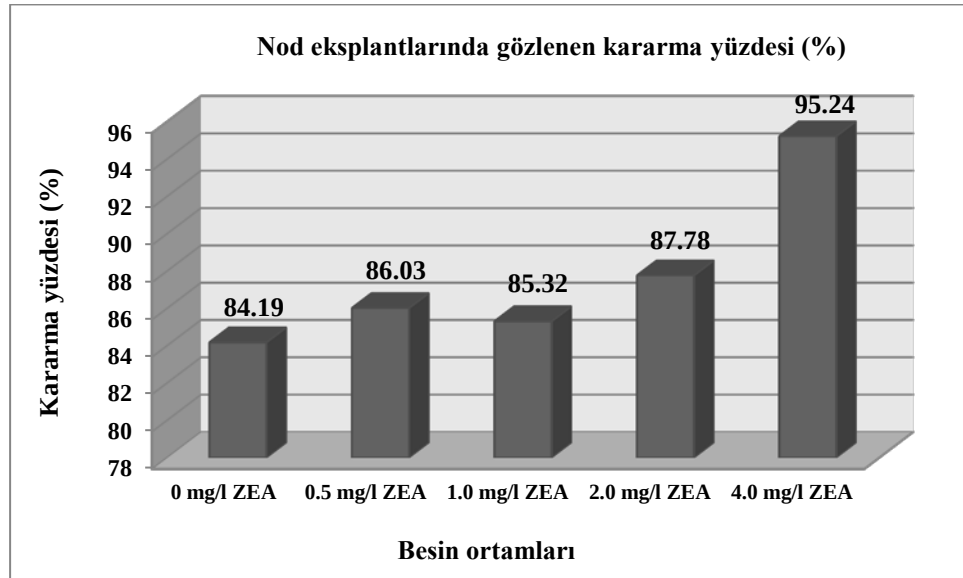


Şekil 4.31 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Domat çeşidinde daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi yapılan bu denemede de büyük bir karararma problemi ile karşılaşmıştır. Besin ortamlarının karararma üzerine etkisi önemsiz olmakla birlikte karararma oranı %95.24'e kadar çıkmıştır (Çizelge 4.49 ve Şekil 4.32).

Çizelge 4.49 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarında gözlenen kararma yüzdesi (%)

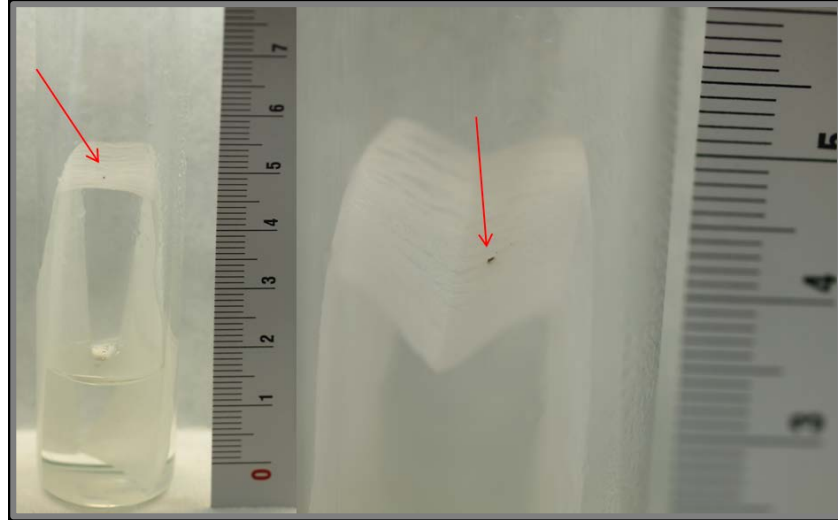
Besin ortamı	Nodal eksplantlarda gözlenen kararma yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.
1	84.62	83.33	84.62	84.19
2	85.71	85.71	86.67	86.03
3	85.71	93.33	76.92	85.32
4	83.33	93.33	86.67	87.78
5	85.71	100	100	95.24



Şekil 4.32 Domat çeşidinde farklı konsantrasyonlarda ZEA içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarında gözlenen kararma yüzdesi (%)

4.6.2 Meristem kültürü

Gemlik ve Domat çeşitlerinde hem yarı katı, hem de sıvı OM_b ve WPM besin ortamlarında meristem kültürü denemeleri kurulmuştur. Daha önceki meristem kültürü denemesinde olduğu gibi tüm ortamlarda kültüre alınan meristemlerde her iki çeşitte de 3 günde kararmalar başlamış ve 30 gün sonunda eksplantların hepsi karardığından sürgün rejenerasyonu gözlenememiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 Sıvı ortamda kültüre alınan meristemlerde kararma

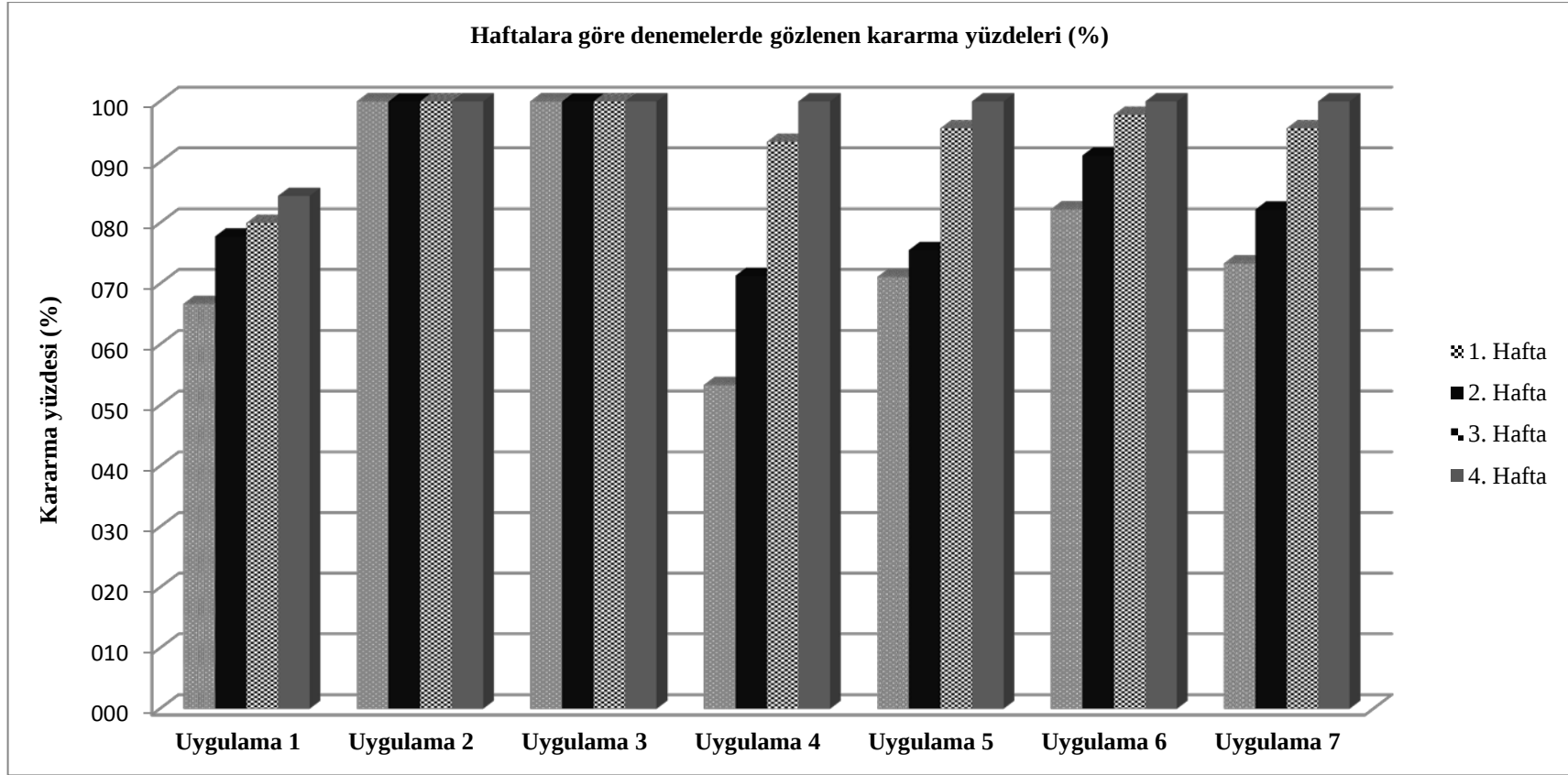
4.6.3 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Domat çeşidinde gözlenen yüksek oranda kararma probleminin çözümü için farklı denemeler kurulmuştur. Denemelerin bir kısmında sterilant madde olarak kullanılan NaOCl solüsyonunun sterilizasyon süresi 15 dakikadan 10 dakikaya indirilmiş ve NaOCl solüsyonu yerine $HgCl_2$, anolit gibi başka sterilant maddeler kullanılmıştır. Diğer bir denemede sterilizasyondan sonra eksplantlar 3 saat steril saf suda bekletildikten sonra kültüre alınmış ve kurulan deneme 1 hafta karanlıkta muhafaza edildikten sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarına çıkarılmıştır. Bunun dışında eksplantlar sterilizasyondan önce 100 mg/l askorbik asitte 2 saat süre ile bekletildikten sonra steril edilmiş ve kültüre alınan nodlar bir önceki denemede olduğu gibi öncelikle 7 gün sürekli karanlıkta muhafaza edilmiş, daha sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoda alınmışlardır. Tüm denemelerde nodal eksplantlar 0.5 mg/l BA içeren besin WPM ortamında kültüre alınmıştır. Uygulamaların her hafta düzenli olarak gözlemleri yapılmış ve hafta hafta denemelere ait kararma yüzdeleri çıkarılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.50 ve Şekil 4.34’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.50 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)*

Uygulama	Kültür Süresi															
	1. Hafta				2. Hafta				3. Hafta				4. Hafta			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	66.67	66.67	66.67	66.67	73.33	80.00	80.00	77.78	80.00	80.00	80.00	80.00	86.67	86.67	80.00	84.45
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	53.33	53.33	53.33	53.33	73.33	80.00	60.67	71.33	100	86.67	93.33	93.33	100	100	100	100
5	73.33	73.33	66.67	71.11	80.00	73.33	73.33	75.55	86.67	100	100	95.56	100	100	100	100
6	80.00	80.00	86.67	82.22	93.33	86.67	93.33	91.11	100	100	93.33	97.78	100	100	100	100
7	73.33	73.33	73.33	73.33	86.67	86.67	73.33	82.22	100	100	86.67	95.56	100	100	100	100

*Tekerrür başına 15 adet nod eksplantı kullanılmıştır.



Şekil 4.34 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)

İstatistiki değerlendirmeye göre, uygulama, süre (hafta) ve uygulama*süre interaksyonu %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.51). Veriler süre bakımından ele alındıklarında, 3. ve 4. haftada tüm uygulamalarda ortalama kararma oranı sırasıyla %94.60 ve %97.78'e kadar çıkarak ilk grupta yer almışlardır (Çizelge 4.52). Uygulamaların kararma üzerine etkilerine bakıldığında, en yüksek değer sterilant madde olarak $HgCl_2$ 'nin kullanıldığı 2. ve 3. uygulamalardan (%100), en düşük değer ise NaOCl uygulama süresinin 15 dakikadan 10 dakikaya indirildiği 1. uygulamadan (%77.23) elde edildiği görülmektedir. İkili interaksiyon açısından değerlendirildiğinde, birinci haftanın sonuçlarına göre eksplantların 30 dakika süre ile anolit ile steril edildikleri 4. denemede en az kararma gözlenirken (%53,33), $HgCl_2$ 'nin farklı süreleri ile steril edilen eksplantlarda (2. ve 3. denemeler) kararma yüzdesi %100'e kadar ulaşmıştır. İkinci hafta sonuçlarında yine anolitin farklı sürelerinin denendiği 4 ve 5. (sırasıyla %71.33 ve %75.55) uygulamalar ve NaOCl süresinin azaltıldığı 1 uygulama (77.78) en az kararmanın olduğu uygulamalar olarak gözlenmiştir. Üçüncü haftada en az kararma oranı (%80.00) 1. uygulamada gözlenmiş ve diğer uygulamalarda bu oran artmıştır. Dördüncü haftada 1. deneme hariç (%84.45) diğer denemelerin hepsinde kararma oranı %100 olmuştur (Çizelge 4.50 ve Çizelge 4.53). Yapılan uygulamaların hiç birinde sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.51 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Uygulama	6	5983.005	997.167	66.113**	2.268	3.154
Süre	3	5042.787	1680.929	111.446**	2.776	4.166
Uygulama*süre	18	3336.014	185.334	12.288**	1.794	2.395
Hata	56	844.642	15.083			
Genel	83	15206.448	183.210			

* = α :0,005 önemlilik düzeyi

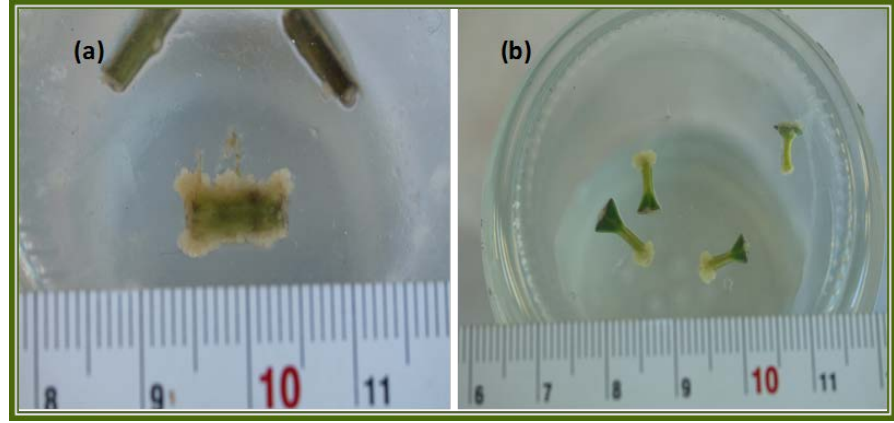
** = α :0,001 önemlilik düzeyi

4.6.4 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi

Domat çeşidinde bu dönem kurulan nod kültürü denemelerinde 0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l ZEA içeren WPM ortamlarında nodlardan sürgün rejenerasyonu az olmasına ve eksplantlar tamamen kararmalarına rağmen, bazı eksplantların bazal kısımlarında besin ortamları içerisinde yeşil kallus oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.35). Bu çeşitte kararma sorunun çözümüne yönelik çalışmalara, nod ve meristem kültürü denemelerine devam edilmesinin yanı sıra, çeşidin kallus oluşturma potansiyelinden de faydalanılmasına karar verilmiş ve bu amaçla, 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OM_b ortamında kallus kültürleri kurulmuştur. Eksplant olarak yaklaşık 2 cm boyunda yapraklar, 1-1.5 cm uzunluğunda internodyumlar ve petioller kullanılmıştır. Bu denemeden elde edilen 30 günlük sonuçlar Çizelge 4.53 ve Şekil 4.36’da gösterilmiştir.



Şekil 4.35 Domat çeşidinde 4 mg/l ZEA içeren WPM besin ortamında kararan eksplantın bazal kısmında gelişen yeşil kallus oluşumu



Şekil 4.36 Domat çeşidinde kültürden 30 gün sonra 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OM_b ortamında (a) internodyum (b) petiol eksplantlarında gözlenen kallus oluşumları

Çizelge 4.53 Domat çeşidinde 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren OM_b ortamında kültüre alınan yaprak, petiol ve internod eksplantlarının kallus oluşturma oranları (%)*

Eksplant tipi	Kallus oluşum oranları (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
Yaprak	0	0	0	0
İnternod	40	40	40	40
Petiol	80	80	80	80

*Tekerrür başına 15 adet eksplant kullanılmıştır.

Kallus oluşturma oranı en fazla ortalama %80 olarak petiollerde gözlenmiştir. Yaprak eksplantları ise tamamen karardığından kallus meydana gelmemiştir (Çizelge 4.53).

4.7 Ocak-Haziran 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.7.1 Nod kültürü denemeleri

Gemlik çeşidinde yapılan nod kültürü denemelerinde fidandan alınan yeni sürgünlerin odunsu dokusu oluşmuş olduğundan sterilizasyon aşamasında eksplantlarda hafif kararma meydana gelmiştir. Eksplantlar besin ortamlarında

kültüre alındıktan 1 hafta sonra kararmalar artmış ve 1 ay sonunda tamamen karardıklarından sürgün rejenerasyonu gözlenememiştir.

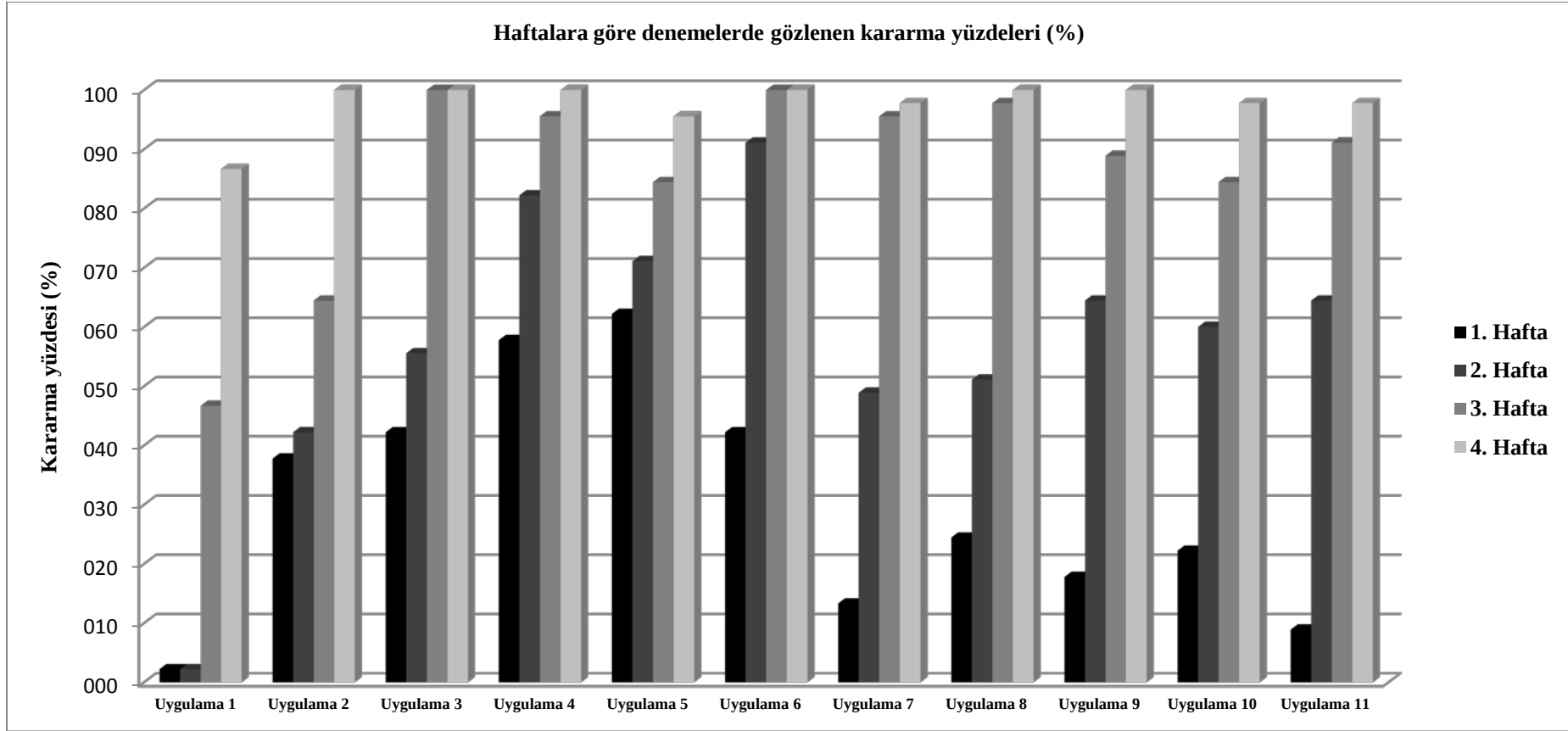
4.7.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar

Bu dönemde yapılan kararma problemini çözmeye yönelik çalışmalarda; kültüre alınan eksplantlara +4°C'de 1 hafta soğuk uygulaması yapılmış, kullanılan besin ortamının pH'sı 5.0'a ayarlanarak nodal eksplantlar bu ortamda kültüre alınmış, eksplantların sterilizasyonundan sonra durulama için +4°C'de steril saf su kullanılmıştır. Bunların dışında kararmayı önlemek amacıyla askorbik asit ve sitrik asit, PVP, aktif karbon gibi kararmayı önleyici maddeler kullanılmıştır. Eksplantlar 0.25 mg/l ZEA içeren OM_b ortamında kültüre alınmışlardır. Yapılan uygulamaların her hafta düzenli olarak gözlemleri yapılmış ve elde edilen veriler Çizelge 4.54 ve Şekil 4.37'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.54 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)*

Uygulama	Kültür Süresi															
	1. Hafta				2. Hafta				3. Hafta				4. Hafta			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	0.00	6.67	0.00	2.22	0.00	6.67	0.00	2.22	53.33	46.67	40.00	46.67	80.00	93.33	86.67	86.67
2	33.33	33.33	46.67	37.78	33.33	46.67	46.67	42.22	53.33	73.33	66.67	64.44	100	100	100	100
3	40.00	33.33	53.33	42.22	46.67	60.00	60.00	55.56	100	100	100	100	100	100	100	100
4	60.00	60.00	53.33	57.78	80.00	86.67	80.00	82.22	100	100	86.67	95.56	100	100	100	100
5	60.00	66.67	60.00	62.22	66.67	73.33	73.33	71.11	86.67	80.00	86.67	84.45	93.33	93.33	100	95.55
6	40.00	46.67	40.00	42.22	93.33	86.67	93.33	91.11	100	100	100	100	100	100	100	100
7	13.33	6.67	20.00	13.33	46.67	46.67	53.33	48.89	86.67	100	100	95.56	93.33	100	100	97.78
8	20.00	26.67	26.67	24.45	53.33	46.67	53.33	51.11	93.33	100	100	97.78	100	100	100	100
9	20.00	13.33	20.00	17.78	66.67	60.00	66.67	64.45	86.67	86.67	93.33	88.89	100	100	100	100
10	20.00	26.67	20.00	22.22	60.00	60.00	60.00	60.00	80.00	86.67	86.67	84.45	93.33	100	100	97.78
11	6.67	13.33	6.67	8.89	66.67	60.00	66.67	64.45	86.67	93.33	93.33	91.11	93.33	100	100	97.78

*Tekerrür başına 15 adet nod eksplanti kullanılmıştır.



Şekil 4.37 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3., ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)

Kararma yüzdeleri; uygulama, süre (hafta), uygulama*süre interaksyonuna göre düzenlenerek Çizelge 4.55’de sunulmuştur. İstatistiki değerlendirmeye göre, uygulama, süre ve uygulama*süre interaksyonu, %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.55). Haftalara göre kararma oranları incelendiğinde, tüm uygulamalarda 1. haftada %30.10 olan kararma oranı 4. haftada %97.78’e çıkmıştır. Uygulamalar dikkate alındığında, en yüksek kararma oranı %83.89 ile besin ortamına 100 mg/l askorbik asit + 150 mg/l sitrik asitin eklendiği 4. uygulamadan, en düşük kararma oranı ise (%34.45) eksplantların kültüre alındıktan sonra 1 hafta süre ile +4 °C’de karanlıkta muhafaza edildikleri 1. uygulamadan elde edilmiştir (Çizelge 4.56). İkili interaksyon açısından değerlendirildiğinde, birinci haftanın sonuçlarına göre 1. uygulamada en az kararma gözlenirken (%2.22), askorbik asit ve sitrik asit kullanılarak yapılan ve aynı grupta yer alan 4. ve 5. uygulamalarda kararma yüzdeleri sırasıyla %57.78 ve %62.22’ye kadar ulaşmıştır. 1. uygulama 2, 3 ve 4. haftada kararmasının en az gözlendiği uygulama olmuş, 3. ve 4. haftada kararma oranlarında artış gözlenmiştir (sırasıyla %46.67 ve %86.67). 4. hafta sonunda 1. uygulama hariç diğer uygulamalarda kararma oranı %95.55-%100 oranında gözlenmiştir. Yapılan uygulamaların hiç birinde sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.55 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Uygulama	10	22031.235	2203.124	99.141**	1.973	2.580
Süre	3	91251.728	30417.243	1368.776**	2.723	4.046
Uygulama*süre	30	14758.873	491.962	22.138**	1.698	1.750
Hata	88	1955.556	22.222			
Genel	131	129997.392	992.347			

* = α :0,005 önemlilik düzeyi

** = α :0,001 önemlilik düzeyi

Çizelge 4.56 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili LSD gruplandırması*

Uygulama	Kültür süresi									
	1. Hafta	Gruplar	2. Hafta	Gruplar	3. Hafta	Gruplar	4. Hafta	Gruplar	Haftaların Ortalamaları	Gruplar
1	2.22	f	2.22	g	46.67	e	86.67	b	34.45	f
2	37.78	b	42.22	f	64.44	d	100	a	61.11	e
3	42.22	b	55.56	cde	100	a	100	a	74.45	c
4	57.78	a	82.22	a	95.56	ab	100	a	83.89	a
5	62.22	a	71.11	b	84.45	c	95.55	ab	78.33	bc
6	42.22	b	91.11	a	100	a	100	a	83.33	ab
7	13.33	de	48.89	ef	95.56	ab	97.78	a	63.89	de
8	24.45	c	51.11	def	97.78	ab	100	a	68.34	d
9	17.78	cde	64.45	bc	88.89	bc	100	a	67.78	d
10	22.22	cd	60.00	cd	84.45	c	97.78	a	66.11	de
11	8.89	ef	64.45	bc	91.11	abc	97.78	a	65.56	de
Uygulamaların ortalamaları	30.10	d	57.58	c	86.26	b	97.78	a		

*Uygulamalar için HKO değeri 22.222; LSD değeri 5.067'dir.

*Süre (hafta) için HKO değeri 22.222; LSD değeri 3.055'dir.

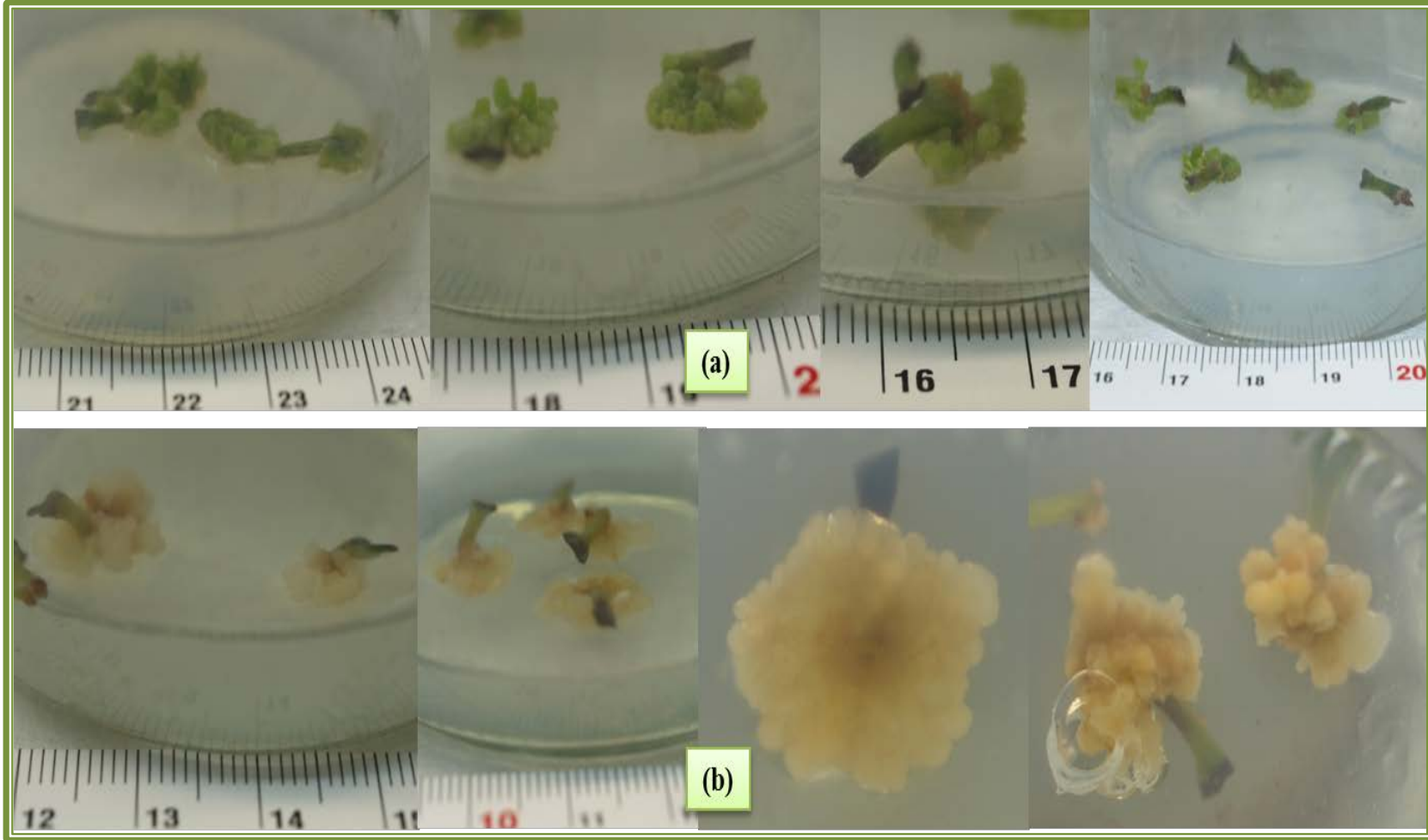
*Uygulama*süre interaksyonu için HKO değeri 22.222; LSD değeri 10.133'tür.

4.7.3 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi

Domat çeşidinde kallus elde etmek için Temmuz-Aralık 2011 döneminde en iyi kallus oluşturduğu gözlenen yaprak petiolleri kullanılmıştır. Hem yaprak hem de gövde parçaları genellikle 1 hafta içinde kararmaya başlamakta ve 2 hafta sonunda tamamen kararmaktadırlar. Petiollerin ise uzun süre yeşil kaldığı ve kallus oluşturma potansiyellerinin diğer eksplantlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden steril edilen petioller 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren OM_b ortamında kültüre alınarak kallus miktarı arttırılmaya çalışılmıştır. Hem karanlıkta hem de aydınlıkta kurulan kültürlerde eşit miktarda kallus gelişimi meydana gelmiştir. Aydınlıktaki kalluslar yeşil karanlıktaki kalluslar krem renkli olarak gözlenmiştir (Şekil 4.38).

4.7.4 Meristem kültürü denemeleri

Gemlik ve Domat çeşitlerinde 0.5, 1.0, 2.0 mg/l ZEA içeren sıvı ve katı WPM ve OM_b ortamlarında meristem kültürü denemeleri kurulmuştur. Kullanılan katı ve sıvı ortamlar, farklı besin ortamları ve hormon konsantrasyonlarının her hangi bir farklılığı gözlenmemiş ve her iki çeşitte de 1. haftadan itibaren kararmalar başlamış ve 2. hafta sonunda da hepsi kararmıştır.



Şekil 4.38 Domat çeşidinde (a) aydınlık koşullarda elde edilen yeşil renkli kalluslar (b) karanlık koşullarda elde edilen krem renkli kalluslar

4.8 Temmuz-Aralık 2012 Döneminde Gerçekleştirilen Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.8.1 Nod kültürü denemeleri

Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacı ile bu çeşide ait fidanlardan alınan eksplantlar 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l dozlarında BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Ortamların içerikleri Çizelge 3.9’da verilmiştir. Nod kültürü denemelerine ilişkin 45 günlük veriler aşağıda sunulmuştur.

4.8.1.1 Gemlik çeşidine ait fidanlardan kurulan nod kültürü denemelerinden elde edilen sonuçlar

Farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında kurulan nod kültürlerinde; sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%) (Çizelge 4.57), nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) (Çizelge 4.59), elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm) (Çizelge 4.61), elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet), elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm) (Çizelge 4.62), sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%) (Çizelge 4.63) gibi parametreler irdelenmiştir.

Sürgün oluşturan nod eksplantı yüzdesi bakımından yapılan istatistiki incelemede kullanılan besin ortamlarının bu parametre üzerine etkisi %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.58). Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%93.33)’nin en fazla gözlendiği 4 mg/l BA içeren besin ortamı birinci grupta yer alırken, bunu %84.45 rejenerasyon oranı ile 2mg/l BA veya 4 mg/l KİN içeren besin ortamı takip etmektedir. En az sürgün rejenerasyonu (%28.89) ise 0.5 mg/l KİN eklemiş besin ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.57).

Çizelge 4.57 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)**

Besin Ortamı	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	12	12	11	11.67	80.00	80.00	73.33	77.78 bc
2	12	12	13	12.33	80.00	80.00	86.67	82.22 b
3	12	13	13	12.67	80.00	86.67	86.67	84.45 ab
4	14	14	14	14.00	93.33	93.33	93.33	93.33 a
5	5	4	4	4.33	33.33	26.67	26.67	28.89 e
6	7	7	8	7.33	46.67	46.67	53.33	48.89 d
7	12	10	13	11.67	80.00	66.67	86.67	77.78 bc
8	13	13	12	12.67	86.67	86.67	80.00	84.45 ab
9	7	7	7	7.00	46.67	46.67	46.67	46.67 d
10	7	6	6	6.33	46.67	40.00	40.00	42.22 d
11	10	11	11	10.67	66.67	73.33	73.33	71.11 c
12	7	6	6	6.33	46.67	40.00	40.00	42.22 d

* Eksplant sayısı tekrerr başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 19.752; LSD değeri 10.150'dir.

Çizelge 4.58 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	11	15469.463	1406.315	71.197**	2.225	3.113
Hata	24	474.059	19.752			
Genel	35	15943.522	455.529			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

□

Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlardan elde edilen toplam sürgün sayıları Çizelge 4.59’da gösterilmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonunun gözlemlendiği 4 mg/l BA ortamı aynı zamanda toplam sürgün sayısı açısından da en fazla değeri (84 adet) vermiş ve her iki noddan da (bilateral) sürgün çıkışları olmuştur. Eksplant başına elde edilen sürgün sayısı açısından değerlendirildiğinde, besin ortamlarının etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.60). Eksplant başına en fazla sürgün sayısı (1.87 adet) 4 mg/l BA içeren besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.59).

Çizelge 4.59 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)**

Besin Ortamı	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
1	21	20	20	61	1.40	1.33	1.33	1.36 c
2	22	22	22	66	1.47	1.47	1.47	1.47 b
3	23	23	23	69	1.53	1.53	1.53	1.53 b
4	28	28	28	84	1.87	1.87	1.87	1.87 a
5	8	8	7	23	0.53	0.53	0.47	0.51 g
6	12	13	13	38	0.80	0.87	0.87	0.84 e
7	23	21	23	67	1.53	1.40	1.53	1.49 b
8	23	23	23	69	1.53	1.53	1.53	1.53 b
9	11	11	11	33	0.73	0.73	0.73	0.73 f
10	10	10	10	30	0.67	0.67	0.67	0.67 f
11	18	18	18	54	1.20	1.20	1.20	1.20 d
12	8	9	9	26	0.53	0.60	0.60	0.58 g

* Eksplant sayısı tekerrür başına 15 adettir.

**Testte kullanılan HKO değeri 0.001; LSD değeri 0.071’dir.

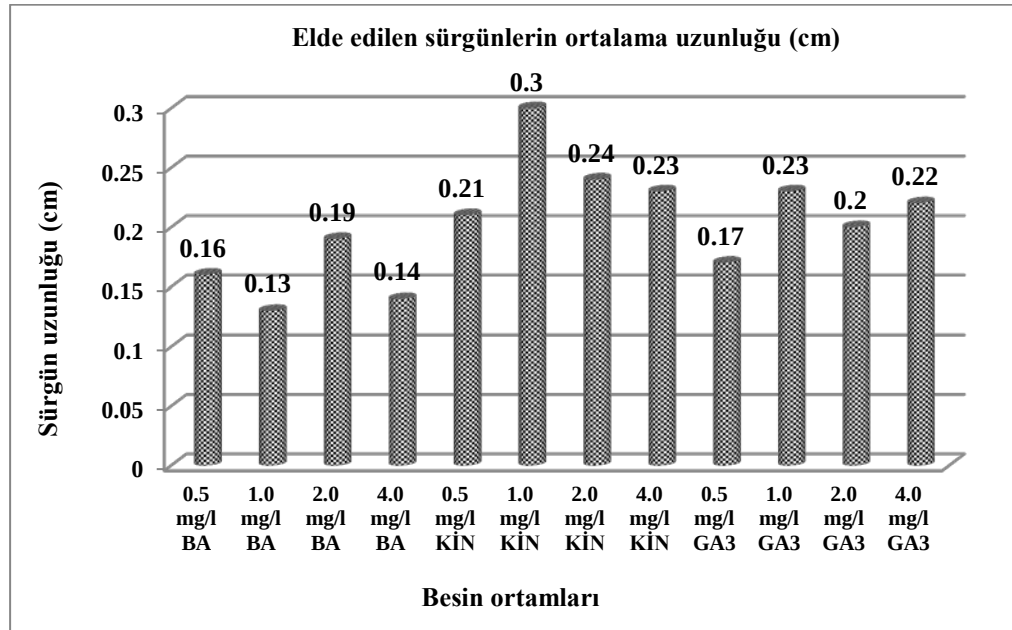
Çizelge 4.60 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	11	6.912	0.628	642.603**	2.225	3.113
Hata	24	0.023	0.001			
Genel	35	6.935	0.198			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

Kullanılan besin ortamlarının elde edilen sürgünlerin ortalama boyları (cm), yaprak sayısı (adet) ve yaprak boyu (cm) üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.61; Çizelge 4.62 ve Şekil 4.39; Şekil 4.40; Şekil 4.41). Elde edilen sürgün başına ortalama uzunluklar 0.13-0.30 cm arasında değişmekle birlikte, en fazla boy uzunluğu 1 mg/l KİN içeren besin ortamında, en az boy uzunluğu ise 1 mg/l BA içeren besin ortamında gözlenmiştir.



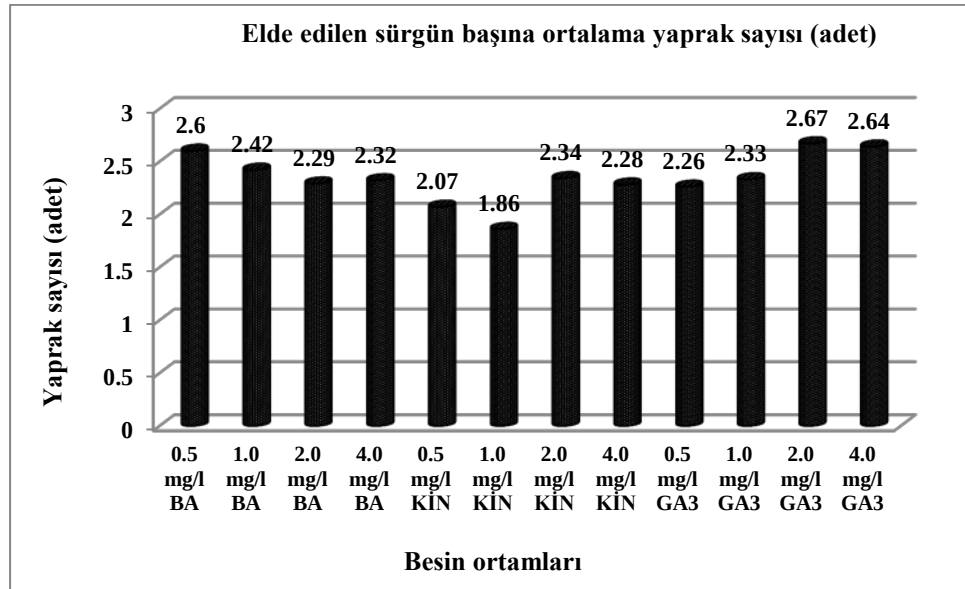
Şekil 4.39 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)

Çizelge 4.61 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, K₁N ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında nod eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)

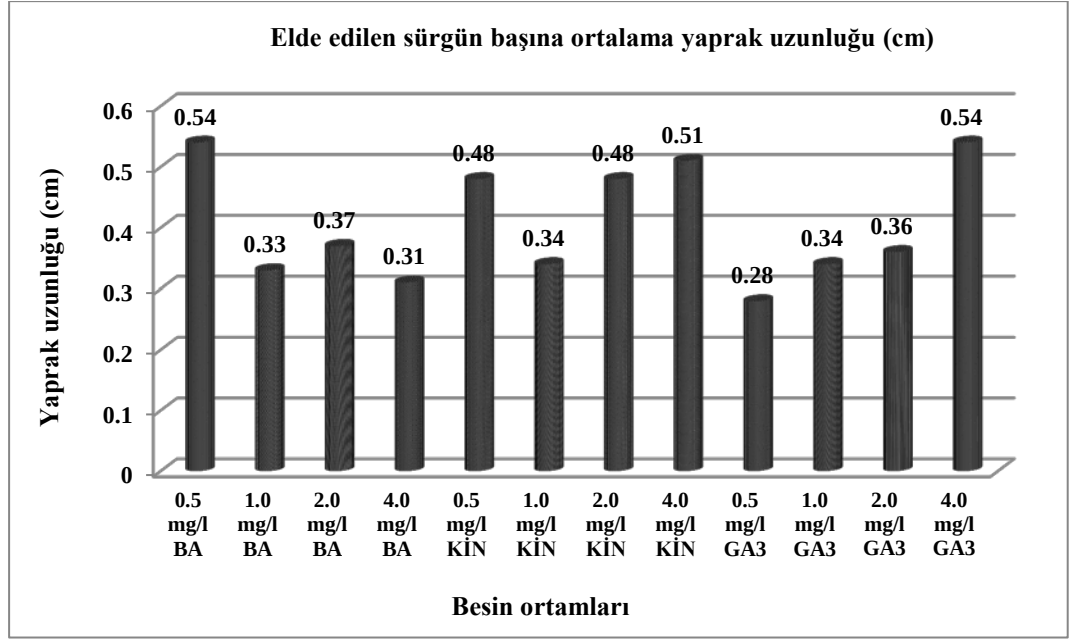
Besin Ortamı	Elde edilen sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	0.13	0.12	0,22	0.16
2	0.12	0.13	0.14	0.13
3	0.26	0.14	0.16	0.19
4	0.17	0.13	0.11	0.14
5	0.18	0.33	0.11	0.21
6	0.29	0.29	0.31	0.30
7	0.27	0.25	0.20	0.24
8	0.36	0.14	0.20	0.23
9	0.12	0.16	0.24	0.17
10	0.12	0.30	0.26	0.23
11	0.13	0.20	0.26	0.20
12	0.15	0.22	0.28	0.22

Çizelge 4.62 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet) ve ortalama yaprak uzunluğu (cm)

Besin Ortamı	Elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)				Elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	2.58	2.13	3.09	2.60	0.53	0.48	0.62	0.54
2	2.25	2.50	2.50	2.42	0.26	0.35	0.39	0.33
3	2.21	2.31	2.35	2.29	0.45	0.28	0.39	0.37
4	2.21	2.29	2.46	2.32	0.46	0.34	0.13	0.31
5	2.20	2.00	2.00	2.07	0.25	0.48	0.70	0.48
6	2.00	2.14	1.44	1.86	0.41	0.34	0.27	0.34
7	2.21	2.35	2.46	2.34	0.55	0.47	0.43	0.48
8	2.38	2.12	2.33	2.28	0.65	0.37	0.52	0.51
9	2.00	2.21	2.57	2.26	0.19	0.32	0.34	0.28
10	2.00	2.17	2.83	2.33	0.28	0.45	0.30	0.34
11	2.55	2.36	3.09	2.67	0.36	0.35	0.38	0.36
12	2.86	2.38	2.67	2.64	0.42	0.30	0.89	0.54



Şekil 4.40 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına yaprak sayısı (adet)



Şekil 4.41 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında elde edilen sürgün başına ortalama yaprak uzunluğu (cm)

Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan elde edilen sürgünlerin hepsinde vitrifikasyon gözlenmiş (Şekil 4.42) ve ortamlara göre vitrifikasyon oranları Çizelge 4.63’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiki analize göre, besin ortamlarının vitrifikasyon üzerine etkisi %1 önemli bulunmuştur (Çizelge 4.64). Elde edilen sürgünlerde en fazla vitrifikasyon oranı (%100) 4 mg/l BA, 0.5, 1.0 ve 4.0 mg/l GA₃ içeren besin ortamlarında gelişen sürgünlerde, en düşük vitrifikasyon oranı ise (%70.59) 0.5 mg/l BA içeren besin ortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.63). Vitrifikasyon olmayan bazı sürgünlerde morfolojik farklılıklar meydana gelmiştir (Şekil 4.43).

Çizelge 4.63 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında sürgülerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)*

Besin Ortamı	Sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ortalama
1	71.43	66.67	73.68	70.59 e
2	80.95	80.95	83.33	81.74 d
3	90.48	90.48	87.50	89.49 bc
4	100	100	100	100 a
5	75.00	75.00	71.43	73.81 e
6	81.81	85.71	84.62	84.05 cd
7	83.33	83.33	84.00	83.55 d
8	91.30	91.67	100	94.32 b
9	100	100	100	100 a
10	100	100	100	100 a
11	89.47	86.36	92.31	89.38 c
12	100	100	100	100 a

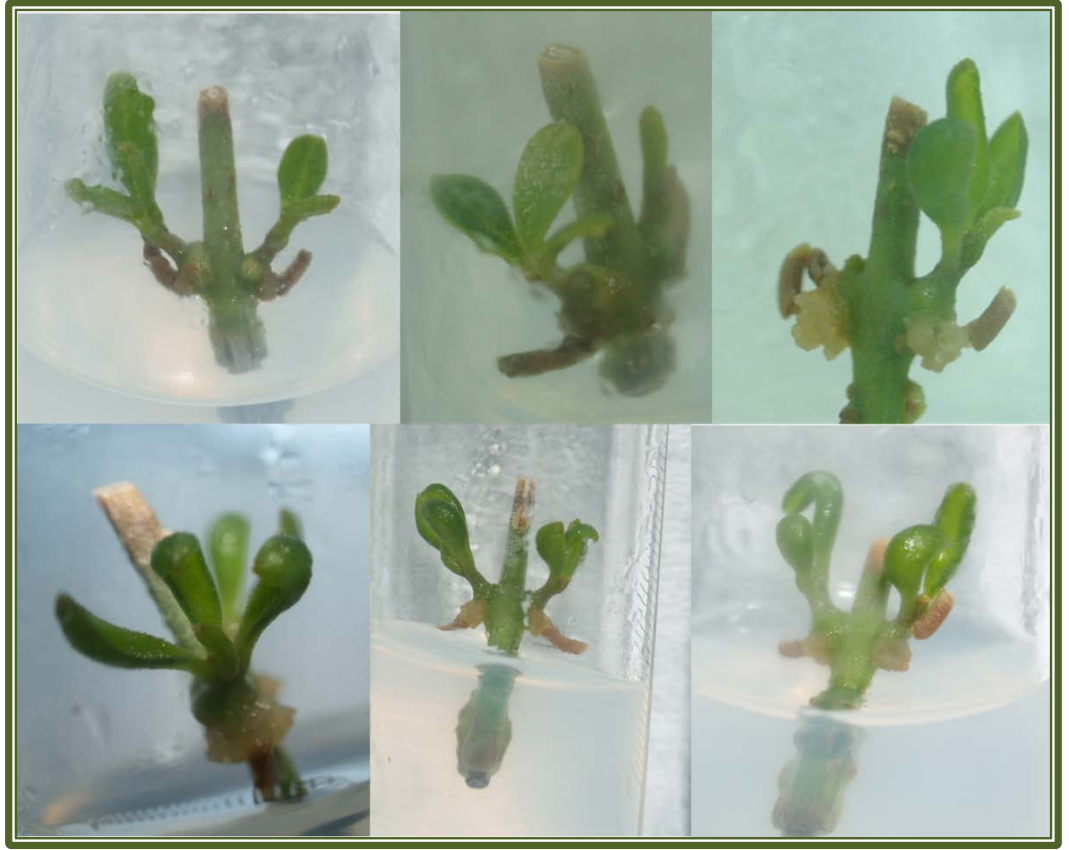
*Testte kullanılan HKO değeri 4.861; LSD değeri 5.035'dir.

Çizelge 4.64 Gemlik çeşidinde farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında sürgülerde gözlenen vitrifikasyon yüzdesi (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

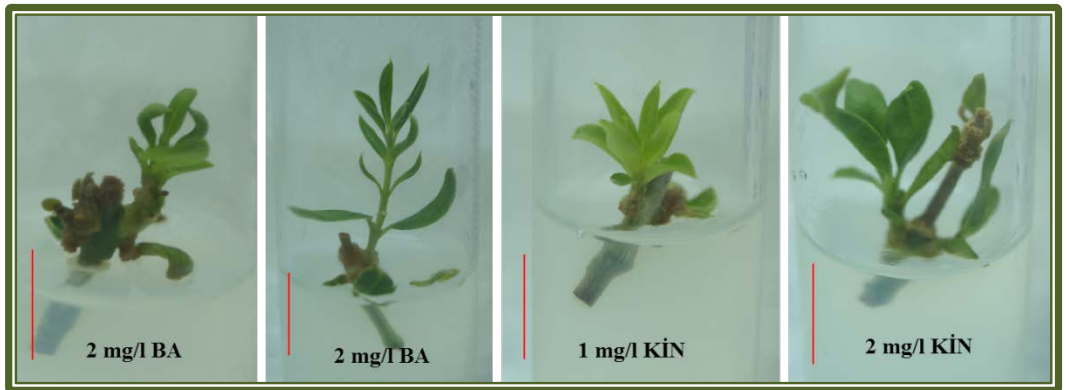
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	11	3573.639	324.876	66.832**	2.225	3.113
Hata	24	116.667	4.861			
Genel	35	3690.306	105.437			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi



Şekil 4.42 Gemlik çeşidinde BA, KİN, GA₃ içeren besin ortamlarında vitrifikasyon gözlenen sürgünler



Şekil 4.43 Gemlik çeşidinde BA, KİN içeren besin ortamlarında gelişen sürgünlerde meydana gelen morfolojik farklılıklar (bar=1cm)

4.8.2 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan uygulamalar

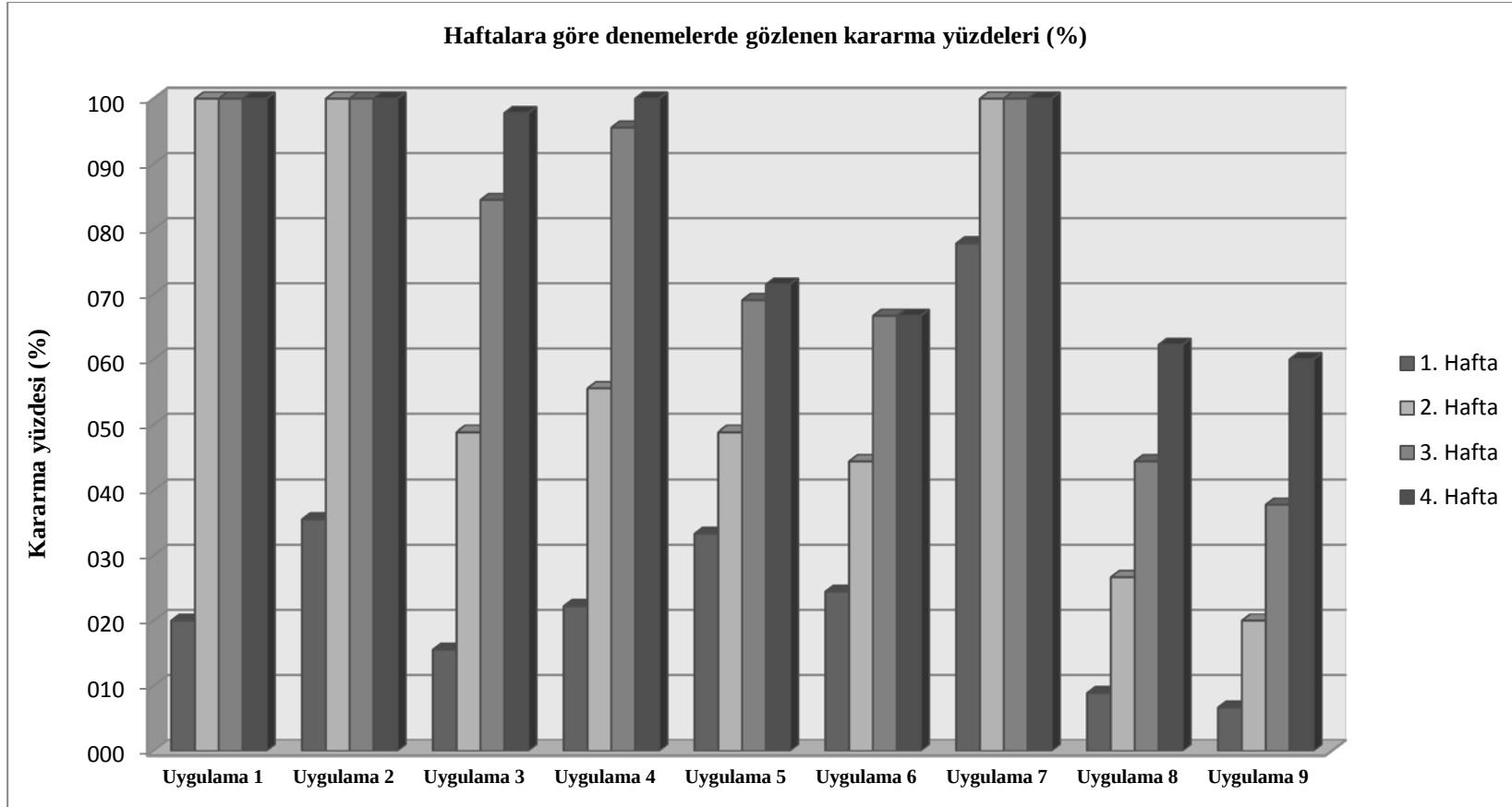
Temmuz-Aralık 2012 döneminde Domat çeşidinde gözlenen kararma sorununun çözümü için denemelere devam edilmiş ve yapılan uygulamaların her hafta düzenli olarak gözlemleri yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.65’de gösterilmiştir. Kararma problemi ile ilgili kurulan denemelerde besin ortamı olarak 2.0 mg/l BA, 20 g/l mannitol ve 6.5 g/l Plant agar içeren OM_b kullanılmıştır. Kararma yüzdeleri; uygulama, süre (hafta), uygulama*süre interaksiyonuna göre düzenlenerek Çizelge 4.67’de sunulmuştur. İstatistiki değerlendirmeye göre, uygulama, süre ve uygulama*süre interaksiyonu, %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.66). Haftalara göre kararma oranları incelendiğinde, tüm uygulamalarda 1. haftada kararma oranı %27.16 iken, 4. haftada %84.24’e çıkmıştır. Uygulamalar açısından değerlendirildiğinde, en yüksek kararma oranı (%94.45) eksplantların 4 hafta süresince loş ışıktaki muhafaza edildiği 7. uygulamada, en düşük kararma oranı ise (%31.11) eksplantların geçici daldırma sistemine sahip RITA biyoreaktörlerinde kültüre alındığı 9. uygulamada gözlenmiştir (Çizelge 4.67). İkili interaksiyon açısından bakıldığında, birinci haftanın sonuçlarına göre 7. uygulama hariç diğer uygulamaların hepsinde kararma oranı %50’nin altında olmuştur. En düşük kararma oranı eksplantların bütün halinde steril edildikten sonra tek nodlara bölündüğü 8. uygulama ve 9. uygulamalardan elde edilmiştir (sırasıyla %8.89 ve %6.67). İkinci haftada, bakırlı bileşiği (CuSO₄.5H₂O) çıkarılmış 2.0 mg/l BAP içeren OM_b ortamında kültüre alınan eksplantlarda (1. uygulama) ve zeytinyağı ile kaplanıp kültüre alınan eksplantlarda (2.uygulama) kararma oranlarında ani bir artış meydana gelmiş ve %100 olmuştur. Kararmanın en az gözlemlendiği 8 ve 9. uygulamalarda 2. haftada kararma oranı sırasıyla %26.67 ve %20.00 iken, üçüncü haftada ise sırasıyla %44.45 ve %37.78 olarak gözlenmiştir. Dördüncü haftada en az kararma oranı yine 9. uygulamada (%60) gözlenmiştir. Eksplantların 2 nod (uygulama 5), 3 nod (6. uygulama) içerecek şekilde kültüre alındığı ya da yaprakları uzaklaştırıldıktan sonra gövdenin bütün halinde steril edildiği ve daha sonra tek nod içerecek şekilde kültüre alındığı (uygulama 8) uygulamalarda kararma oranları sırasıyla %71.48, %66.67 ve %62.22 bulunmuştur.

Çizelge 4.65 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)*

Uygulama	Kültür Süresi															
	1. Hafta				2. Hafta				3. Hafta				4. Hafta			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	20.00	20.00	20.00	20.00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	33.33	33.33	40.00	35.55	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	13.33	20.00	13.33	15.55	46.67	46.67	53.33	48.89	86.67	80.00	86.67	84.45	93.33	100	100	97.78
4	20.00	20.00	26.67	22.22	53.33	60.00	53.33	55.55	93.33	100	93.33	95.55	100	100	100	100
5	33.33	33.33	33.33	33.33	46.67	46.67	53.33	48.89	66.67	73.89	66.67	69.08	73.89	73.89	66.67	71.48
6	26.67	26.67	20.00	24.45	46.67	46.67	40.00	44.45	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67
7	73.33	80.00	80.00	77.78	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	6.67	6.67	13.33	8.89	26.67	26.67	26.67	26.67	46.67	46.67	40.00	44.45	60.00	60.00	66.67	62.22
9	6.67	6.67	6.67	6.67	20.00	20.00	20.00	20.00	33.33	40.00	40.00	37.78	60.00	60.00	60.00	60.00

142

*Tekerrür başına 15 adet nod eksplantı kullanılmıştır.



Şekil 4.44 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%)

Çizelge 4.66 Domat çeşidinde kararma probleminin çözümüne yönelik yapılan denemelerde 1., 2., 3. ve 4. haftaya ait kararma yüzdeleri (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Uygulama	8	44624.614	5578.077	738.565**	2.084	2.788
Süre	3	52703.995	17567.998	2326.090**	2.744	4.094
Uygulama* süre	24	12769.149	532.048	70.446**	1.682	2.086
Hata	72	543.786	7.553			
Genel	107	110641.544	1034.033			

* = α :0,005 önemlilik düzeyi

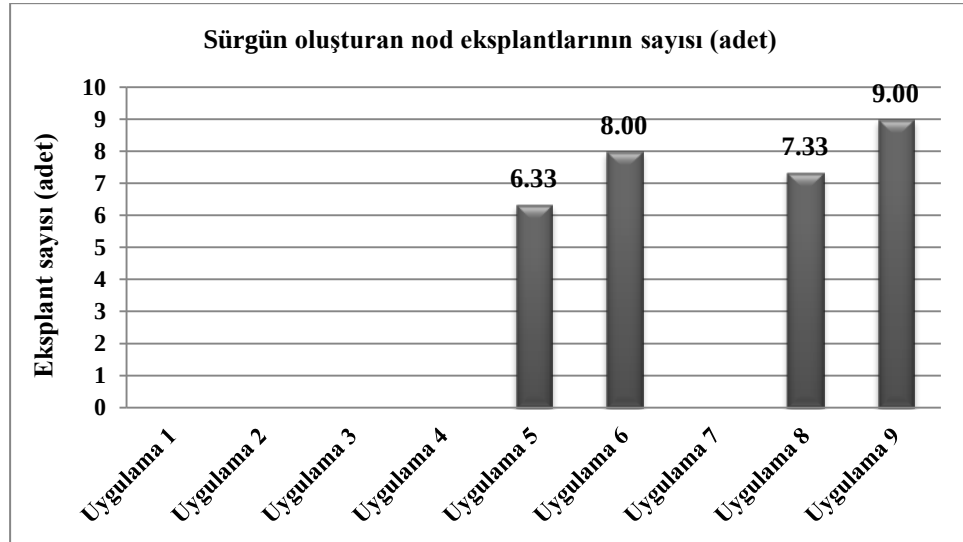
** = α :0,001 önemlilik düzeyi

Domat çeşidinde kararma probleminin çözümü için daha önceki dönemlerde yapılan çalışmalarda sürgün rejenerasyonu gözlenmezken uygulama 5, 6, 8 ve 9'dan sürgün rejenerasyonu başarılmıştır. Sürgün rejenerasyonuna ait bilgiler Çizelge 4.68; Çizelge 4.69 ve Şekil 45; Şekil 46; Şekil 47 ve Şekil 48'de verilmiştir. Yapılan uygulamalar istatistiki açıdan incelendiğinde uygulamaların sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%) ve eksplant başına elde edilen sürgün sayıları (adet) üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdesi 9. uygulama için %60.00, 6. uygulama için %53.33, 8. uygulama için %48.89 ve 5. uygulama için %42.22 olarak hesaplanmıştır. Eksplant başına elde edilen sürgün sayısı ise 9. uygulamada 1.09 adet, 6. uygulamada 0.69 adet, 8. uygulamada 0.93 adet, 5. uygulamada ise 0.58 adet olmuştur. RITA biyoreaktörlerinde gelişen sürgünlerin (uygulama 9) hepsinde vitrifikasyon gözlenirken (Şekil 4.50), diğer uygulamalardan elde edilen sürgünlerde vitrifikasyon meydana gelmemiştir (Şekil 4.49). 9. uygulamada sürgünler 1. haftadan sonra çıkmaya başlarken, diğer uygulamalarda sürgün çıkışı 2. haftadan sonra meydana gelmiştir.

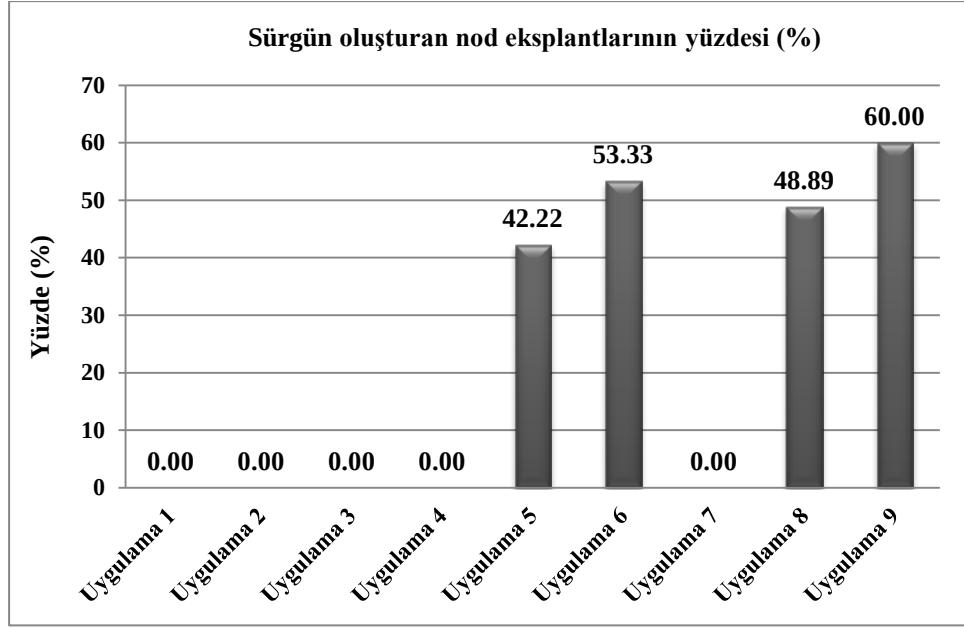
Çizelge 4.68 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Deneme	Sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)				Sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	6	6	7	6.33	40.00	40.00	46.67	42.22
6	8	8	8	8.00	53.33	53.33	53.33	53.33
7	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	8	7	7	7.33	53.33	46.67	46.67	48.89
9	9	9	9	9.00	60.00	60.00	60.00	60.00

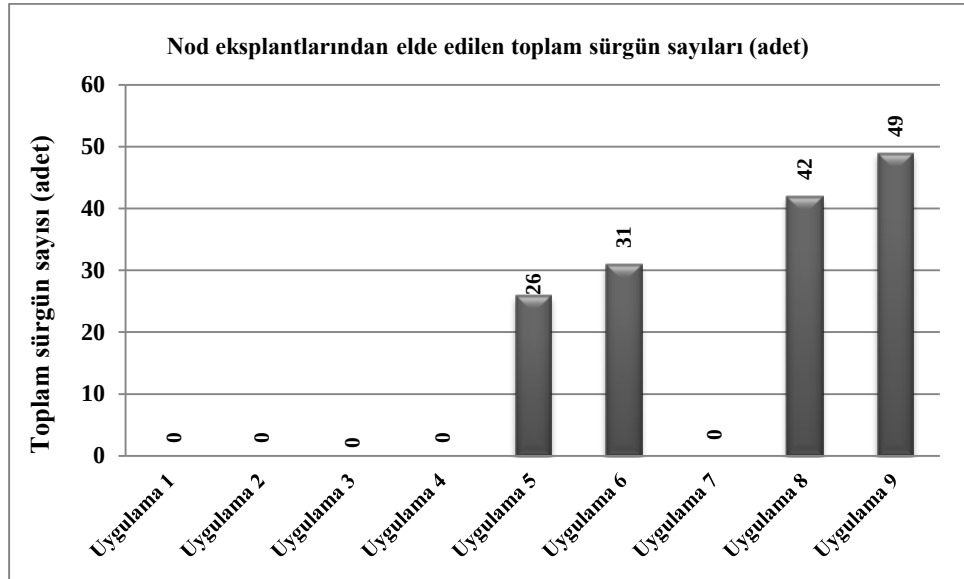
* Eksplant sayısı tekrerr başına 15 adettir.



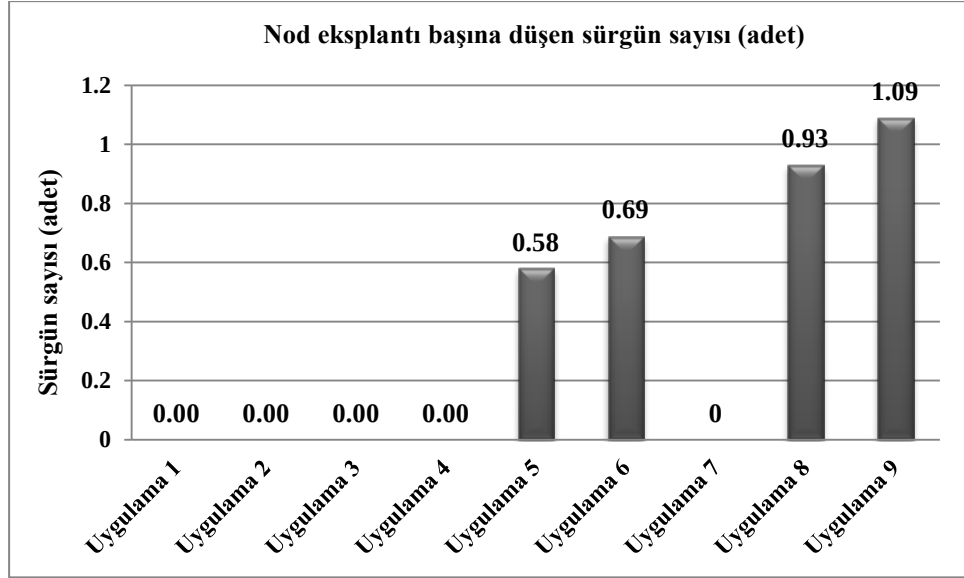
Şekil 4.45 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı (adet)



Şekil 4.46 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda sürgün oluşturan nod eksplantlarının yüzdesi (%)



Şekil. 4.47 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



Şekil. 4.48 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.69 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) ve nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)

Deneme	Nod eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)				Nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
1	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	9	9	8	26	0.60	0.60	0.53	0.58
6	11	10	10	31	0.73	0.67	0.67	0.69
7	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
8	14	14	14	42	0.93	0.93	0.93	0.93
9	15	18	16	49	1.00	1.2	1.07	1.09



Şekil 4.49 Domat çeşidinde karamanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda (a) 8. uygulamadan (b) 5. ve 6. uygulamalardan elde edilen sürgünler (bar=1 cm)



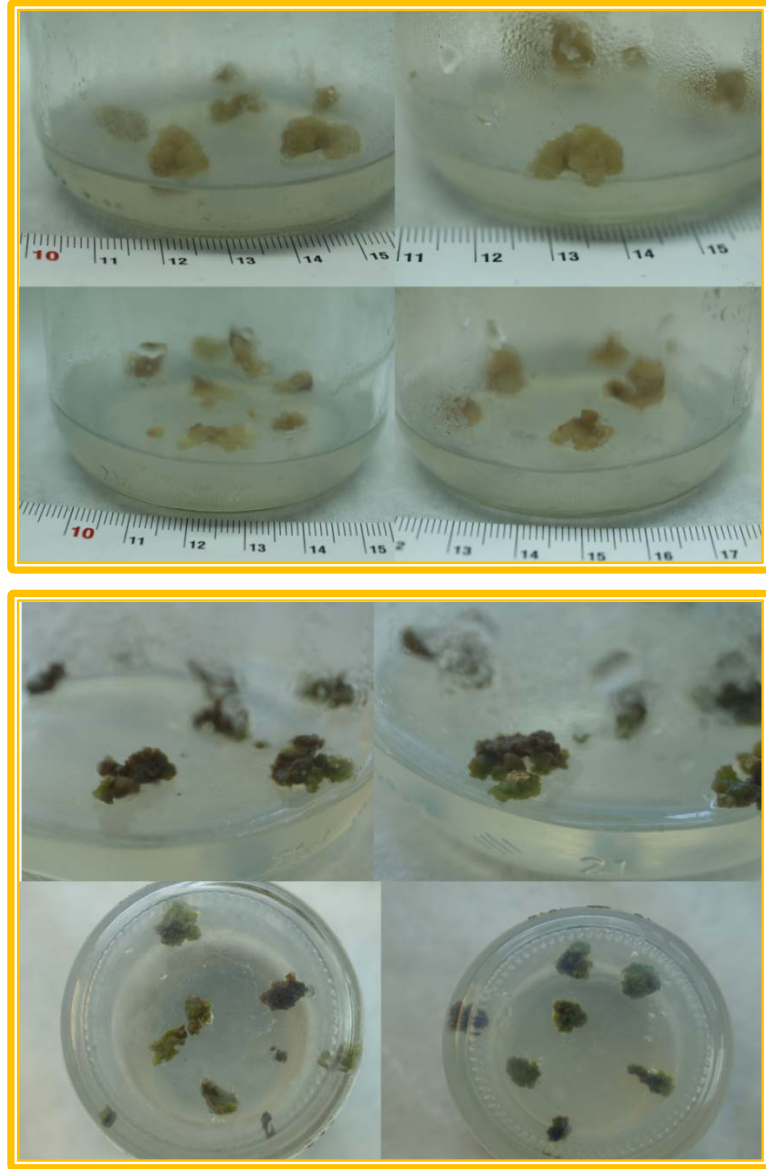
Şekil 4.50 Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan uygulamalarda RITA biyoreaktörlerinde sıvı kültürlerde sürgün rejenerasyonu (bar=1 cm)

4.8.3 Domat çeşidinde kallus kültürü denemesi

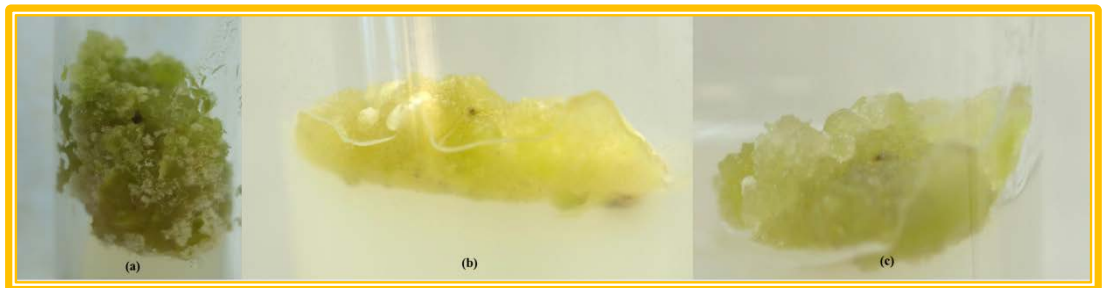
Kallus kültürü denemelerinde petiol eksplantlarından elde edilen kalluslar 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP içeren OM_b besin ortamlarında kültüre alınarak kallus miktarı arttırılmaya çalışılmıştır. Kültürler sürekli karanlık ortamda ve 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir. Ancak kallus kültürlerinde altkültürde gelişme oldukça yavaş olmuştur (Şekil 4.51).

4.8.4 Meristem kültürü denemeleri

Bu dönemde yapılan meristem kültürü denemelerinde sterilizasyondan sonra stereo mikroskop altında iki yaprak taslağı ile birlikte meristemin kendisi izole edilerek doğrudan besin ortamı üzerine değil, nörs doku olarak kullanılan pamuk, tütün ve mısır kallusları üzerine transfer edilmişlerdir. Diğer kurulan meristem kültürü denemelerinde elde edilen sonuçlar gibi bu uygulamalarda da 30 gün sonunda tüm eksplantlar kararmıştır (Şekil 4.52).



Şekil 4.51 Domat çeşidinde 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP içeren OM_b ortamında altkültürü yapılan kalluslar



Şekil 4.52 Nörs doku olarak kullanılan (a) pamuk kallusu (b) mısır kallusu (c) tütün kallusu üzerinde kültüre alınan ve kararan zeytin meristemleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Zeytin bitkisinin klasik metotlarla üretiminde bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Çelikle üretimde zor köklenen çeşitlerde köklenme oranı düşük olduğundan istenilen verim elde edilememekte ve böyle bir durumda kullanılan metot ekonomik olmamaktadır. Çelikle üretimin etkin olmadığı durumda tercih edilen aşıl ile üretim metodunda ise üretim periyodu 4-5 yıl gibi uzun bir zamanı kapsamaktadır (Kaya, 2006; Özen ve Kaya, 2007; Rostami and Shahsavari, 2012). Klasik metotlarla üretimin zorlandığı noktada ise doku kültürü yöntemleri çözüm olarak devreye girebilmekte ve zeytinin *in vitro* çoğaltımı ile klasik üretim tekniklerinde karşılaşılan bazı zorlukların üstesinden gelinebilmektedir (Rugini, 1995; Rugini et al., 1999; García-Ferriz et al., 2002). Araştırmamızda Türkiye için ekonomik öneme sahip iki zeytin çeşidinin, köklenme oranı yüksek olan Gemlik (%80-90) ve köklenmesi zor gerçekleşen Domat (%10-15) çeşitlerinin, *in vitro* koşullarda rejenerasyon kapasitelerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

Gemlik çeşidinin orijini Bursa'nın Gemlik ilçesi olup, Marmara Bölgesindeki toplam zeytin ağaçlarının yaklaşık %80-85'ini oluşturmaktadır (Mete ve Çetin, 2006; Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 2012). Yüksek verimli bir çeşit olup, erken olgunlaşır ve iyi bakıldığı takdirde düzenli ürün verir. Çeşit soğuğa karşı kısmen dayanıklı ve verticillium solgunluğuna orta derecede duyarlıdır. Gemlik çeşidine ait çeliklerin köklenme oranları diğer çeşitlere nazaran daha yüksek olduğundan, ülkemizde zeytin fidanı üretiminde büyük önem taşımaktadır. Türkiye'de üretilen zeytin fidanlarının yaklaşık %90-95'i gibi büyük bir kısmını Gemlik çeşidi oluşturduğundan, bu çeşit oldukça geniş bir coğrafi dağılım göstermektedir (Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 2012). Canözer (1991)'e göre gemlik sofralık olarak kullanılan önemli bir çeşittir ve meyveleri orta irilikte, parlak, koyu siyah renkli ayrıca tat açısından üstün özelliklidir. Yağ bakımından zengin olduğu için meyveleri yağlık olarak da işlenebilmektedir (Kalenderoğlu, 2010; Kutlu ve Şen, 2011). İspanya'ya ait sofralık olarak bilinen “Manzanilla” çeşidi ile rekabet edebilecek tek çeşidimiz “Gemlik”tir. Gemlik çeşidi aslında sofralık siyah zeytin olarak bilinmesine rağmen yağlık zeytin kategorisinde yer alan Ayvalık çeşidinden %6 daha fazla yağ içermektedir (Doğu Akdeniz Zeytin Birliği, 2010).

Domat çeşidinin orijini Manisa ilinin Akhisar ilçesidir. Türkiye'deki mevcut zeytin ağacı miktarının %1.4'ünü oluşturmaktadır. Yeşil sofralık zeytin olarak kullanılmakta ve ayrıca eti çekirdekten kolay ayrıldığından dolgulu yeşil zeytin olarak da değerlendirilebilmektedir. Domat çeşidi erken meyveye yatar ve düzenli ürün verir. Sulu şartlarda soğuğa hassas olup zeytin dal kanseri ve kızıl kurda karşı kısmen dayanıklıdır (Mete ve Çetin, 2006; Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 2012). Domat zeytin çeşidi ülkemizin ekonomik öneme sahip çok önemli bir çeşidi olup, köklenme yüzdesi (%15) düşüktür. Geliştirilen sisleme yöntemi ile yarı odunsu yapraklı yeşil çeliklerle kısa zamanda çok sayıda zeytin fidanı elde edilebilmesine rağmen domat gibi köklenme yüzdesi düşük olan çeşitlerde bu yöntemle ekonomik olarak fidan elde edilmesi mümkün olamamaktadır. Köklenmesi düşük olan çeşitler için köklenmeyi uyarıcı değişik kimyasal maddeler ve bunların büyüme düzenleyici ile birlikte kombinasyonları denenmektedir. Ancak, bu tür çalışmalarda henüz istenen sonuçlara ulaşılamamıştır (Özen ve Kaya, 2007).

Doku kültürü çalışmalarında ilk adım kullanılacak eksplantlar için uygun bir sterilizasyon prosedürünün oturtulmasıdır. Tez çalışmasının başlangıcında sterilizasyon için deneme kurulmamış, Gürel vd. (2006)'nin kullandığı sterilizasyon yöntemi kullanılmış ve eksplantlar %10'luk NaOCl solüsyonunda 10 dakika steril edilmişlerdir. Sterilizasyonu yapılan nodal eksplantlar 0, 1.0, 2.0 mg/l konsantrasyonlarında ZEA, BA, KİN içeren OM₆ ve modifiye DKW besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Ancak yapılan çalışmada Gemlik çeşidinde %28.89-80.00 arasında, Domat çeşidinde ise %13.33-55.56 arasında steril eksplant elde edilmiştir. Gürel vd. (2006)'nin gerçekleştirdiği çalışmada steril eksplant yüzdesi Gemlik çeşidinde 75.40, Domat çeşidinde ise %65.10 olarak bulunmuştur. Yapılan tez çalışmasında belirtilen araştırma makalesinden farklı olarak eksplantlar kararmanın önlenmesi amacı ile 24 saat 100 mg/l Askorbik asit çözeltisinde bekletilmiştir. Bu bekletme süresi steril eksplant elde etme başarısını etkilemiş olabilir. Çünkü gün boyunca kesilmiş halde Askorbik asit içerisinde bekletilen nod eksplantları steril olmayan suyu dokuları içerisine aldığından eksplantların yüzeyi kontaminantlardan arındırılsa bile iç dokular bu kontaminantları içerdiğinden kontaminasyon sorunu oluşmuş olabilir. Ocak-Haziran 2009 döneminde gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar

doğrultusunda çalışmanın bundan sonraki aşamasında Gemlik ve Domat çeşitleri için hem serada yetiştirilen fidanlardan alınan eksplantlar, hem de bahçede bulunan ağaçlardan alınan eksplantlar için sterilizasyon protokolünün oturtulmasına çalışılmıştır.

Doku kültürü tekniklerinde sterilizasyon yönteminin belirlenmesinde en önemli faktörlerden biri kullanılan donör bitkinin muhafaza edildiği çevredir. Zeytin ile ilgili yapılan doku kültürü çalışmalarında genellikle dış koşullarda bahçelerde veya doğada yetişen ağaçlardan alınan materyaller kullanılmıştır (Roussos and Pontikis, 2002; Zacchini and De Agazio, 2004; Rostami and Shahsavari, 2012). Ağaçların donör bitki olarak kullanılmalarının avantajı üretim için bol miktarda materyal alınabilmesidir. Bu avantajından faydalanmak amacıyla Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait bahçelerden Temmuz-Aralık-2009 döneminde ağaçlardan materyal alınarak bunlar için uygun sterilizasyon protokolü oturtulmaya çalışılmıştır. Sterilizasyon için farklı sürelerde (10, 15 ve 20 dk) %15'lik NaOCl uygulandığında steril eksplant oranı Gemlik çeşidinde en fazla %15.55, Domat çeşidinde ise %22.21 olmuştur. Sterilizasyon başarısını arttırmak amacı ile yapılan fungusit uygulamalarında eksplantlar 1 saat ve 24 saat olarak farklı sürelerde fungusit ile ön muamele edilmişler ve daha sonra 15'lik NaOCl ile steril edilmişlerdir. Fungusitle yapılan 1 saatlik ön muamele sadece NaOCl'nin kullanıldığı sterilizasyon yöntemi ile hemen hemen aynı sonuçları vermiştir. Ancak eksplantların 24 saat fungusit ile muamele edilmesi sonucu Gemlik çeşidinde %93.33, Domat çeşidinde ise %82.22 oranında başarı elde edilmiştir. Elde edilen yüksek sterilizasyon başarısına rağmen ağaçlardan alınan nodal eksplantların hepsi kültüre alındıktan sonra 2 hafta içerisinde kararmıştır.

Temmuz-Aralık 2010 döneminde bahçedeki ağaçlardan materyal alınarak farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanmış ve kararma olmadan steril materyal oranı arttırılmaya çalışılmıştır. Bu dönemde alınan eksplantlarda kararmayı azaltmak için NaOCl'nin konsantrasyonu %10'a indirilmiştir. Sterilizasyon uygulamaları bu konsantrasyon üzerinden yapılmıştır. Hipoklorit solüsyonlarının bakterisidal etkisi hipokloröz asit (HOCl) ve OCl^- iyonundan kaynaklanmaktadır. Hipokloröz asit, OCl^- iyonundan daha aktiftir, çünkü klorun dezenfektan etkisi hafif asidik hipoklorit solüsyonlarında en iyi olmaktadır ve pH değerindeki bir

artışla hipokloröz asidin OCl^- iyonuna dönüşmesinin bir sonucu olarak bu etki azalmaktadır. Bundan dolayı, bitki materyalinin en etkili dezenfeksiyonu için hipoklorit solüsyonu pH 6-7 değerinde kullanılmalıdır (George, 1993; Niedz and Bausher, 2002). Bu bilgiden hareketle, NaOCl 'nin pH'sı 7.0'a ayarlanarak fungusitle birlikte farklı uygulamalar yapılmıştır. Diğer sterilizasyon uygulamalarında Bitki Koruyucu Karışımı (Plant Preservative Mixture (PPM™)) kullanılmıştır. PPM; ısıya karşı kararlı, bitki doku kültürlerinde besin ortamlarındaki bakteri ve fungusların büyümesini önlemek veya öldürmek amacı ile kullanılan geniş spektrumlu bir biosid/fungusit'tir. PPM'deki aktif bileşenler; methylisothiazolinone, magnezyum klorit, magnezyum nitrat, sodyum benzoat ve potasyum sorbat'tır. Bu inorganik tuzlar birlikte, krebs çemberi ve elektron taşıma zincirindeki spesifik temel enzimleri hedef alarak bunların yapısını bozarlar. Besin ortamında 0.5-2.0 ml/l konsantrasyonlarda kullanılması önerilmektedir (Compton and Koch, 2001; Niedz and Bausher, 2002). Çalışmamızda ağaçlardan alınan nodal eksplantlar fungusit ön uygulamalı ya da uygulamasız NaOCl ile steril edildikten sonra içerisinde 1, 2 ve 3 ml/l ppm bulunan besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu dönemde ağaçlar için uygulanan tüm sterilizasyon prosedürleri değerlendirildiğinde, eksplantların 24 saat fungusitle muamelesinden sonra %10'luk NaOCl ile 15 dk steril edilerek 3 ml/l PPM içeren besin ortamlarına aktarıldığı uygulamadan Gemlik çeşidinde %66.67 Domat çeşidinde ise %55.56 oranında steril eksplat elde edilmiştir. Ancak yine Temmuz-Aralık-2009 döneminde gerçekleştirilen sterilizasyon uygulamalarında olduğu gibi eksplantlar tamamen kararmıştır.

Ağaçlardan alınan eksplantlara yapılan sterilizasyon uygulamaları elde edilen steril materyal oranını arttırsa da kültürlerde ciddi oranlarda kararma sorununa neden olduğundan eksplant kaynağı olarak sadece seradaki fidanlar kullanılmasına karar verilmiştir. Seradaki Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan eksplantların sterilizasyonu için %10 veya %15'lik NaOCl solüsyonu ile 10 dakika sterilizasyon denemeleri yeterli olmuştur. Bu denemelere göre %15'lik NaOCl konsantrasyonunda %97.33, %10'luk NaOCl konsantrasyonunda ise %64.00 sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. Sterilizasyon sonucunda kararma oranları (%15 için %17.33 ve %10 için %6.67) oldukça az gözlemlendiği gibi OM_b ortamında kültüre alınan eksplantlarda sürgün rejenerasyon oranı %15'lik

uygulamada %85.33'e kadar çıkmıştır. Eksplant başına elde edilen sürgün sayısı 1.96 adet bulunmuştur. Domat çeşidinde ise %10 veya %15'lik NaOCl solüsyonu ile 10 dakika sterilizasyon uygulamalarından sırasıyla %37.33 ve %48.00 oranında steril eksplant elde edilmiştir. Ancak bu oranlar yeterli görülmeyip eksplantlar 24 saat süre ile 3 g/l fungusit (CAPTAN) solüsyonunda bekletildikten sonra farklı konsantrasyonlardaki (%7.5 ve %10) NaOCl solüsyonlarında değişik sürelerde (7.5 dk ve 10 dk) steril edilmişlerdir. Bu uygulamalarda en yüksek sterilizasyon başarısı (%78.33) fungusit ön uygulamasından sonra %10'luk NaOCl ile 10 dakika steril edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Ancak fungusit kullanımı eksplantlarda kararma oranını arttırmış ve tüm eksplantlar kararmıştır. Sadece NaOCl solüsyonunun kullanıldığı sterilizasyon denemelerinde kararma oranları %10'luk NaOCl için %41.33, %15'lik NaOCl için %60 olarak belirlemiş ve sırasıyla %48 ve %38.67 oranlarında sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına 0.69 adet ve 0.60 adet sürgün elde edilmiştir.

Seradaki fidanlar için uygun sterilizasyon prosedürü belirlendikten sonra Ocak-Haziran 2009 döneminde Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan 5 yıllık Gemlik fidanlarından alınan nodal eksplantlar farklı konsantrasyonlarda BA, KİN ve ZEA içeren OM_b ve DKW ortamlarında kültüre alınmışlar ve kullanılan temel besin ortamlarından OM_b'de nodal eksplantlardan %31.11 oranında sürgün rejenerasyonu gözlenirken, DKW ortamında hiç sürgün rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Bu durum Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan sürgün rejenerasyonu için OM_b ortamının daha uygun olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün oluşturma verimlerine bakıldığında, en fazla sürgün rejenerasyon oranı (%40) 2 mg/l ZEA içeren OM_b ortamında gözlenmekle birlikte, bunu oldukça yakın değerle (%37,78) 2 mg/l BA veya KİN içeren OM_b ortamları takip etmiştir. Ancak, en iyi sürgün gelişimi ZEA içeren besin ortamlarında meydana gelmiştir. Ayrıca kontrol ortamları dışında bitki büyüme düzenleyicisi içeren tüm besin ortamlarında kültüre alınan eksplantların bazal kısımlarında kallus oluşumu meydana gelmiştir. En büyük kallus oluşumları ise ZEA içeren besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda gözlenmiştir ve bu ortamlarda gelişen sürgünlerin yapraklarının rengi daha açık yeşil olmuştur. Benzer durum, Nebbiara (Zacchini and De Agazio, 2004), *Olea maderensis* (Brito and Santos, 2009) ve *Chondrolia Chalkidikis*

(Antonopoulou et al., 2006) çeşitlerinde de gözlenmiş ve Nebbiara çeşidinde 13.68 μM ZEA, *Olea maderensis*'de 9.12 $\mu\text{mol/l}$ ZEA ve Chondrolia Chalkidikis çeşidinde ise 0.5 mg/l GA_3 içeren besin ortamlarında gelişen sürgünlerin bazal kısımlarında kallus oluşumları meydana gelmiştir. Ayrıca, BA, TDZ ve KİN gibi sentetik büyüme düzenleyicilerinin de kısa sürgün rejenerasyonuna ve sürgünlerin bazal kısımlarında büyük kallus oluşumlarına neden oldukları bilinmektedir (Rugini 1990). Sghir et al. (2005), kolay köklenen ZDH4 ve Lucques, orta düzeyde köklenme kabiliyetine sahip Haouzia, Dahbia, Amellau ve Salonenque ve zor köklenen Picholine marocaine ve Picholine du Languedoc çeşitlerinin mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, en iyi sonuçları ZEA içeren ortamdan elde ettiklerini fakat ZEA'nın mikroçeliklerin bazal kısmında büyük bir kallus kitlesi oluşumuna neden olduğunu ve bu durumun çoğaltım oranını olumsuz yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. ZEA'nın miktarını 13.8 μM 'dan 4.6 μM 'a düşürdüklerinde ise kallus oluşumunun önemli oranda azaldığını ancak çoğaltım oranında fazla bir değişiklik olmadığını belirtmişleridir. Kallus oluşumunun, sürgünün iletim dokuları ile besin ortamı arasındaki bağlantıyı kopardığı ve bu yüzden sürgün kısmına besin ve büyüme düzenleyicisi transferinin engellendiği düşünülebilir. Bunun sonucu olarak da sürgünlerin yapraklarında açık yeşil oluşumlar, sürgün büyümesinde yavaşlama ve buna bağlı olarak sürgün çoğaltım oranında azalmalar gözlenmiş olabilir.

Sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacı ile Gemlik ve Domat çeşitlerine ait nodal eksplantlardan elde edilen sürgünler bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek tekli sürgünler halinde 0, 1.0, 2.0 mg/l konsantrasyonlarında BA, KİN ve ZEA içeren OM_s ve modifiye DKW besin ortamlarında altkültüre alınmışlardır. Hem Gemlik çeşidi, hem de Domat çeşidinde bu ortamlarda sürgün gelişmesi gözlenmemiş ve açık yeşil yapraklı sürgün, yaprak nekrozisi, yaprak ana damarlarının koyu yeşil diğer kısımların açık yeşil olduğu sürgünler ve yaprak absisyonu gibi oluşumlar meydana gelmiştir. Brito and Santos (2009); çalışmalarında, *Olea maderensis* sürgünlerini zeytin sürgün geliştirme ortamındaki (OM) Fe, Mg ve Mn konsantrasyonlarını 2 (OMG), 4 (OMG4) ve 10 (OMG10) katına çıkararak 9.12 $\mu\text{mol/l}$ ZEA içeren ortamda kültüre almışlar ve kontrol olarak 9.12 $\mu\text{mol/l}$ ZEA içeren OM ortamını kullanmışlardır. Sonuç olarak, Fe, Mg ve Mn konsantrasyonlarının iki katına çıkarıldığı ortamdan (OMG)

daha sağlıklı ve yeşil bitkiler elde edildiğini ancak, diğer üç ortamda yapraklarda zamanla kötüleşmeler meydana geldiğini ve yaprak damarları yeşil kalırken damarlar arasındaki dokularda klorozis (açık yeşilden sarıya doğru renklenme), daha yaşlı yapraklarda ise nekrozis gözlemlendiğini ve bu durumun elementlerin eksikliğinden ya da toksisitesinden kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada da aynı durumlar ile karşılaşıldığından, sorunun element eksikliğinden kaynaklandığı düşünülerek Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan elde edilen *in vitro* sürgünlerin bir kısmı, bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek tekli sürgün şeklinde, bir kısmı da kesilmeden bağlı bulundukları ana dokuyu da içerecek şekilde KNO_3 konsantrasyonu artırılmış (5 mg/l) ve 2 mg/l ZEA içeren OM_s ortamında kültüre alınmışlardır. Yapılan bu denemeye göre sürgünlerin boy uzunluklarında dikkate değer bir artış gözlenmezken, sürgün başına ortalama yaprak sayısında önemli bir artış gözlenmiş ve en fazla sayı (4.43 adet) ana dokudan ayrılmayan sürgünlerden elde edilmiştir. Domat çeşidinde de kullanılan sürgünler ana dokudan ayrılarak aynı besin ortamında kültüre alınmış fakat boy uzunluğu ve yaprak sayısı artışı bakımından önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Ancak bu ortamda da her iki çeşitte yaprakların morfolojik görünümünde farklılıklar meydana gelmiş ve özellikle sürgün uçlarına yakın kısımlarda nekrozlar ve yapraklarda kıvrılmalar oluşmuştur. Bu durumda kullanılan ortamın Gemlik çeşidinde yaprak sayısında ve bitki büyümesinde etkili olduğu fakat aynı zamanda KNO_3 miktarının toksik etki yarattığı ve bu yüzden klorozise neden olduğu söylenilebilir.

Temmuz-Aralık 2010 döneminde zeytin güvesinin sebep olduğu zararlardan dolayı, fidanlar kullanılamayacak hale geldiğinden 2011 yılı Mart Ayı içerisinde Zeytincilik Araştırma İstasyonu'ndan yeni fidanlar (2 yıllık Gemlik fidanları ve 5 yıllık Domat fidanları) temin edilmiştir. Alınan yeni fidanlardan nod kültürlerinin oluşturulmasında kullanılacak temel besin ortamını belirlemek amacıyla her iki çeşitte OM_b (Zeytin Başlangıç Ortamı) (Rugini, 1984), modifiye DKW (Driver and Kuniyuki, 1984), OM_s (Rugini, 1984), WPM (Lloyd ve McCown, 1980) ve modifiye OM_s ortamı (içeriğindeki Fe, Mg ve Mn konsantrasyonları iki katına çıkarılmış) (Brito ve Santos, 2009) olmak üzere 5 farklı temel besin ortamı denenmiştir. Gemlik çeşidinde en yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%97.78) WPM ortamında kültüre alınan nodal eksplantlardan elde edilmiş ve bu ortamı

%71.11 oranı ile OM_s ortamı takip etmiştir. WPM ortamında Gemlik çeşidine ait eksplantlarda hiç kararma gözlenmezken, eksplantlarda en fazla kararma (%82.22) DKW besin ortamında gerçekleşmiştir. Gemlik çeşidinde 2009-2010 yılı denemelerinde kullanılan fidanlardan alınan nodal eksplantlardan OM_b ortamında %85.33 oranında sürgün rejenerasyonu gerçekleşirken, kararma oranı %17.33 olmuştur. Aynı ortamda, yeni temin edilen fidanlardan alınan nodal eksplantlarda sürgün rejenerasyonu %42.22 ve kararma %33.33 oranında meydana gelmiştir. Kültüre alınan eksplantın boyutu ve kullanılan nodun bitki üzerindeki konumu da kararma ve sürgün gelişimi üzerine etkili olabilmektedir. Seyhan ve Özzambak (1994)'a göre en iyi sürgün çoğaltımı için sağlıklı dokulardan alınan 2-4 mm gövde çapındaki 3., 4., 5. ve 6. nodlar seçilmelidir. Gemlik bitkisinde başlangıçta Zeytincilik Araştırma İstasyonundan temin edilen 5 yıllık fidanlardan alınan 2-4 mm gövde çapında eksplantlardan, daha sonra temin edilen 2 yıllık fidanlardan alınan 1.5-2.0 mm gövde çapındaki eksplantlara göre daha canlı ve sağlıklı sürgünler elde edilmiştir. İlk kullanılan Gemlik fidanları 5 yıllık, daha sonra temin edilen fidanlar ise 2 yıllık olduğundan, aynı ortamda gözlenen bu farklı sonuçların sebebinin kullanılan fidanların yaşı olduğu düşünülebilir. Ayrıca bitkilerin muhafaza edildiği çevrenin fizyolojik koşulları ya da bitkinin kendi fizyolojik durumu da sürgün rejenerasyon veriminde etkili olabilir.

Domat çeşidinde yapılan temel besin ortamını belirleme denemesinde ise DKW, OM_s ve modifiye OM_s ortamlarında kararma oranları %100'e kadar çıkmıştır. OM_b ortamı ise en az kararmanın (%60) gözleendiği ortamdır. Domat çeşidinde gözlenen bu büyük kararma probleminden dolayı kullanılan beş temel besin ortamında sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Besin ortamları içerisindeki mineral madde içerikleri morfogenezini etkilemektedir. Zeytinin mikroçoğaltımında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi besin ortamı kompozisyonudur (Rugini, 1984; Roussos and Pontikis, 2002). Bu nedenle, çalışacağımız çeşit için öncelikle uygun temel besin ortamını ve içeriğini belirlemek bu çeşidin mikroçoğaltımı için gerekli protokolün geliştirilmesi için önemlidir. Zeytin bitkisinin mikroçoğaltımı, birçok genotipte çoğunlukla temel zeytin ortamı (Olive Medium-OM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu besin ortamı, zeytin apikal sürgünleri ve zigotik embriyolardaki besin içeriklerinin

analiz edilmesiyle formüle edilmiş ve tüm dünyada zeytin mikroçoğaltımı için yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Brito and Santos, 2009). Ancak, hem fiziksel özellikler, hem de besin istekleri; türler ve genotiplere göre değişiklik göstermekte ve çoğaltılmak istenen zeytin çeşidine göre kullanılan temel besin ortamı da değişebilmektedir. Gemlik çeşidinde zeytin için geliştirilen OM yerine WPM besin ortamı *in vitro* çalışmalar için daha uygun bulunmuştur. Fransız zeytin çeşidi olan Aglandau ve Tanche için ½ konsantrasyonda makro element içeren modifiye zeytin ortamının, diğer bir Fransız çeşidi olan Laragne (Binet et al., 2007) ve Chondrolia Chalkidikis çeşidi için WPM temel besin ortamının bu çeşitlerin mikroçoğaltımında daha iyi olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda her iki çeşit içinde eksplant olarak kullanılan materyallerin özellikle odunsu dokusu oluşmamış taze sürgünlerden alınmasına dikkat edilmiştir. Aksi takdirde eksplantlarda gözlenen kararma oranları artmaktadır. Nitekim Haziran-2012'de Gemlik çeşidinde odunsu dokusu oluşmaya başlamış nodal eksplantların 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l dozlarında BA, KİN ve GA₃ içeren WPM besin ortamlarında kültüre alındığı denemede tüm eksplantlarda kararma meydana gelmiştir. Bu tip eksplantlar daha sterilizasyon sırasında esmerleşmeye başlamaktadırlar. Aynı kültürler odunsu dokusu oluşmamış taze eksplantlardan kurulduğunda kararma gözlenmemiştir. Binet et al. (2007), üç Fransız zeytin çeşidinin (Aglandau, Tanche ve Laragne) mikroçoğaltımı konusunda yaptıkları çalışmada eksplant olarak serada yetişen fidanlardan alınan kısmen lignifiye olmuş nodal eksplantları kullandıklarını rapor etmişlerdir.

Temmuz-Aralık 2011 döneminde Gemlik ve Domat zeytin çeşitlerinde yeni fidanlardan alınan tek yıllık sürgünlerin 3, 4, 5 ve 6. nodları kullanılarak 0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l konsantrasyonlarında ZEA, 30 g/l sukroz ve 6.5 g/l Plant agar (Duchefa) içeren WPM besin ortamlarında nod kültürleri oluşturulmuştur. Gemlik çeşidinde nodal eksplantlardan ZEA içeren besin ortamlarında %71.11-%93.33 arasında yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu meydana gelmekle birlikte, en yüksek sürgün rejenerasyon oranı 0.5 mg/l ZEA içeren besin ortamında gerçekleşmiştir. Kontrol ortamında rejenerasyon oranı %84.45 olmuştur. ZEA konsantrasyonu arttıkça rejenerasyon oranında azalma meydana gelmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı en fazla (1.78 adet) yine 0.5 mg/l ZEA içeren

besin ortamında gözlenmekle birlikte, bunu 1.67 adet ile kontrol ortamı ve 1.0 mg/l ZEA içeren besin ortamları takip etmektedir. Elde edilen sürgünlerin ortalama boyları, ortalama yaprak sayıları ve yaprak boyları kullanılan besin ortamlarına göre önemli farklılıklar oluşturmamıştır. Bununla birlikte ortalama sürgün uzunluğu 0.12-0.15 cm arasında, ortalama yaprak sayısı 2.33-3.02 adet arasında değişmektedir ve en yüksek değerler 0.5 mg/l ZEA içeren besin ortamında gelişen sürgünlerde gözlenmiştir. Ortalama yaprak uzunluğu (0.36-0.45 cm) en fazla 4 mg/l ZEA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ancak tüm ortamlardan gelişen sürgünlerde yüksek vitrifikasyon (%84.19-%95.24) gözlenmiştir. Domat çeşidinde ise aynı ortamlarda en yüksek rejenerasyon oranı (%35.55) 4 mg/l ZEA içeren besin ortamında meydana gelmiştir. Aynı ortamda eksplant başına sürgün sayısı 0.58 adet ile en yüksek değer olmuştur. Kontrol ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamlarda hiç sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Domat çeşidinde oluşturulan nod kültürlerinde karşımıza çıkan en büyük sorun kararma problemi olmuştur. Kültürlerde %84.19-%95.24 oranlarında kararma gözlenmiştir.

Temmuz-Aralık 2012 döneminde Gemlik çeşidine ait fidanlardan alınan henüz odunsu dokusu oluşmamış tek yıllık sürgünlerin 1.5-2.0 cm uzunluğunda ve 2 mm kalınlığında 3, 4, 5 ve 6. nodları 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l konsantrasyonlarında BA, KİN ve GA₃ ve ayrıca 30 g/l sukroz ve 6.5 g/l Plant agar içeren WPM besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Gemlik çeşidinde 4.0 mg/l BA içeren besin ortamında; sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı ve yüzdesi (14 adet ve %93,33), nod eksplantından elde edilen toplam sürgün sayısı (84 adet), nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (1.87 adet) en fazla bulunmuştur. Ayrıca 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l konsantrasyonlarında BAP içeren diğer besin ortamlarında da bu değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde Mission çeşidinde yapılan bir çalışmada besin ortamına BA eklenmesi, eksplantların çoğaltımını önemli oranda arttırmıştır. GA₃'in tek başına kullanılması ise çoğaltımda etkili bulunmamıştır (Rostami and Shahsavari, 2012). Kalamon çeşidinin sürgün çoğaltımı için BA'nın tek başına etkili olduğu rapor edilmesine rağmen, 'Chondrolia Chalkidikis' çeşidinde zeatin en etkili bitki büyüme düzenleyicisi olmuştur (Grigoriadou et al., 2002). En düşük sürgün oluşturan nod eksplantlarının sayısı ve yüzdesi (4.33 ve %28.89), nod

eksplantından elde edilen toplam sürgün sayısı (23 adet), nod eksplantı başına düşen sürgün sayısı (0.51 adet) 0.5 mg/l KİN içeren besin ortamında gözlenmiştir. BA ve KİN kullanılan ortamlarda konsantrasyon arttıkça sürgün rejenerasyon oranlarında da artış yaşanmıştır. Ortalama sürgün uzunlukları 0.13-0.30 cm, ortalama yaprak sayısı 1.86-2.67 adet ve ortalama yaprak uzunluğu 0.28-0.54 cm arasında değişmekle birlikte, bu özellikler bakımından en yüksek değerler sırasıyla 1 mg/l KİN, 2 mg/l GA₃ ve 0.5 mg/l BA ile 4 mg/l GA₃ içeren besin ortamlarında gözlenmiştir.

Bazı zeytin çeşitlerinin mikroçoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesine rağmen bunların ticari olarak üretimi yapılamamaktadır. Bunun temel sebeplerinden biri aksillar tomurcukların uyarılması ve akabinde sürgün gelişiminin sağlanması için kullanılan besin ortamında zeatine ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca, zeytin mikroçoğaltımı üzerine yapılan çalışmalarda genellikle karbon kaynağı olarak mannitol kullanılmakta ve sürgün çoğaltımı ve gelişimi için mannitolün daha iyi olduğu belirtilmektedir. Zeatin ve mannitolün kullanımı mikroçoğaltımı yapılan bitkiciklerin final maliyetini ciddi ölçüde arttırmaktadır (Antonopoulou et al., 2006; Roussos and Pontikis, 2002). Çalışılan çeşide bağlı olarak sürgün rejenerasyon ve çoğaltım ortamında kullanılan zeatin miktarı 0.5-10 mg/l arasında değişmektedir (Özden vd., 2010). Ancak zeatin pahalı bir hormon olduğundan zeytinin mikroçoğaltımında zeatin yerine geçebilecek başka bir sitokininin bulunması önemlidir. Gemlik çeşidinde yapılan çalışmalarımızda 4.0 mg/l BA, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l ZEA konsantrasyonu kullanılan ortamlardan daha fazla sürgün rejenerasyonu sağlamıştır. Ayrıca WPM besin ortamında mannitol yerine daha düşük maliyetli sukroz kullanılmaktadır. Bu durum Gemlik çeşidinde mikroçoğaltım için uygun maliyetli bir prosedürün oturtulabileceğini düşündürmektedir.

Gemlik çeşidinde Temmuz-Aralık 2012 döneminde yapılan tüm denemelerden elde edilen sürgünlerde %70.59-%100 arasında değişen oldukça yüksek vitrifikasyon oranlarına rastlanmıştır. Kültürlerde gözlenen vitrifikasyon probleminin kullanılan agardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü tez çalışmasının başlangıcında ilk fidanlardan yapılan denemelerden elde edilen sürgünlerde vitrifikasyon problemi ile karşılaşılmamıştır ve kullanılan besin

ortamında farklı olan sadece katılaştırıcı ajan çeşididir. Yapraklar ve gövdenin şeffaf ve camsı görünümü ile karakterize edilen vitrifikasyon, birçok bitkinin mikroçoğaltım ile üretiminde ciddi fizyolojik bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca vitrifikasyon durumu kültürlerin performansını düşürmekte ya da mikroçoğaltımı yapılan bitkilerin hayatta kalma oranını azaltmaktadır. Vitrikiye olan eksplantlar vitrikiye olmayanlardan daha yüksek su içeriğine sahiptir ve bu yüzden kuru ağırlıkları daha azdır. Düşük agar konsantrasyonu, kullanılan agar çeşidi, besin ortamı, yüksek sitokinin konsantrasyonu, yüksek NH_4 seviyeleri ve düşük K seviyeleri (Singha et al., 1990), kültür kabı içerisindeki yüksek nem (Gupta and Prasad, 2010) ve etilen ve karbondioksit gibi gazların birikmesi (Yadav et al., 2003) vitrifikasyona sebep olarak gösterilmektedir. York ve Vermont Spur Delicious elma çeşitlerinde (*Malus domestica* Borkh.) aynı katılık oranını sağlayan 1.5 g/l Gelrite vitrifikasyona sebep olurken, 7.0 g/l Difco Bacto agar vitrifikasyonu teşvik etmemiştir (Pasqualetto et al., 1988). *Rosa persica* bitkisinde vitrifikasyonu engellemek için 8 g/l agar, 4 g/l phytigel ve 2 g/l agar + 3 g/l phytigel denenmiş ve agar kullanıldığında vitrifikasyon oluşmamıştır (Jafarkhani Kermani et. al., 2010). Bu yüzden agar çeşidi değiştirildiğinde kültürde vitrifikasyon sorununun engellenebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda aynı besin ortamı içeriğine sahip besin ortamlarında farklı morfolojiye sahip sürgünlerin elde edilmesi nedeniyle bu rejenerantların somaklonal varyantlar olabileceğini düşündürmektedir. Ancak Gemlik çeşidine ait fidanların ayrı genotiplere sahip olma olasılığından dolayı bu konuda daha detaylı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nün TAGEM/IY/96/06/05/002 kod no'lu projesinde Gemlik çeşidi hakkında yapılan bir projede 23 adet Klon tespit edilmiş olup, bunlardan sadece "2 adet" "Klon"un "Periyodisite" göstermediği yani her yıl verim verdiği belirlenmiştir (Doğu Akdeniz Zeytin Birliği, 2010). Bu çalışmadan hareketle bizim kullandığımız genotiplerin farklı klonlara ait olabileceği olasılığı göz ardı edilmemelidir. Ayrıca, mikroçoğaltım ile ilgili çalışmalarda bitki büyüme düzenleyicisi kullanıldığında veya büyüme düzenleyicisinin miktarı yüksek olduğunda elde edilen sürgünler ya da bitkiciklerde anormal morfolojik gelişimler gözlenebilmektedir. Seyhan ve Özzambak (1994), Domat ve Memecik çeşitleri ile

yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ile birlikte 0.05 mg/l NAA içeren besin ortamında farklı morfolojiye sahip sürgün gelişimleri gözlemlemişlerdir. En yüksek sürgün sayısı 2.0 mg/l BAP içeren ortamda meydana gelmesine rağmen bu miktardaki BAP konsantrasyonu morfolojik olarak bozuk sürgünlerin oluşmasına sebep olmuştur.

In vivo yetiştirilen bitkiler fungal, bakteriyal ve viral hastalıklar ile bulaşık olabilir, zararlı böcek ve nematodlardan zarar görebilirler. Söz konusu bu mikroorganizmalar (virüs, bakteri ve mantarlar) vegetatif çoğaltım yoluyla taşınmaktadır. Bu nedenle, vegetatif çoğaltmada temiz bir başlangıç materyalinin kullanımı son derece önemlidir. Temiz materyallerin elde edilmesi amacıyla da özel *in vitro* kültür teknikleri geliştirilmiştir ve meristem kültürü bu amaçla kullanılan bir tekniktir. Meristematik hücreleri kullanarak gerçekleştirilen doku kültürü, özellikle virüsten ari bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir bitkinin hücrelerinde virüs konsantrasyonu hücreden hücreye farklıdır ve özellikle apikal sürgün ve kök meristemi hücrelerinin virüs içermesi ihtimali düşüktür. Bu nedenle, meristem kültürlerinden virüsten ari bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Günümüzde meristem kültürü virüs eliminasyonu için rutin olarak uygulanan bir yöntemdir. Ayrıca, meristem kültürü tekniği virüsten ari bitkilerin elde edilmesi amacının yanı sıra donör bitkinin bakteriyal ve fungal patojenler ile enfekte olduğu durumlarda da avantaj sağlamaktadır. Çünkü bitkide terminal bölgenin vasküler farklılaşma bölgesinin üst kısmı patojenik partikülleri pek içermez. Bu nedenle, eğer bulaşık olan bir bitkiden, söz konusu bu bölgeden küçük bir eksplant alınıp *in vitro*'da başarılı olarak geliştirilirse patojensiz bitki elde edilmesi mümkün olmaktadır (Bürün, 2002).

Çalışmamızda zeytin bitkisine ait iki çeşidin *in vitro* koşullara verdiği tepkileri belirlemek amacı ile sadece nod kültürleri değil aynı zamanda meristem kültürü denemeleri de kurulmuştur. Meristem kültürü, meristemin birkaç yaprak taslağı ile birlikte ya da sadece kendisinin, binoküler mikroskop altında izole edilerek, uygun bir besin ortamına yerleştirilerek geliştirilmesidir. Bu amaçla meristemin kendisi stereo mikroskop altında 2 yaprak taslağını da içerecek şekilde (0.3-0.5 mm) izole edildikten sonra 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l ZEA içeren yarı katı ve

SIVI OM_b ve WPM besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Ancak tüm besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlar 2-3. günden başlayarak kararmaya başlamış ve 30 gün sonunda hepsi kararmıştır. Meristemler doğrudan besin ortamlarına alındıklarında karardıklarından nörs doku kullanılmaya karar verilmiş ve oluşturulan pamuk, mısır ve tütün kallusları üzerine izole edilen meristemler kültüre alınmıştır. Ancak bu kültürlerde de besin ortamlarında olduğu gibi tüm eksplantlar kararmıştır. Zeytin ile ilgili sadece bir adet meristem kültürü çalışmasına rastlanmıştır. Khan et al. (2002), Pantaloon çeşidinin meristem ucu kültürlerinde kullanmak için uygun bir sterilizasyon yöntemi oturtmaya çalışmışlar. Yaklaşık 0.5-0.8 mm boyutlarındaki sürgün uçlarını 0.5 mg/l 2 isopentenyladenine (2İP) veya 0.5 mg/l 2İP ile birlikte 150 mg/l cefotaxime içeren OM başlangıç ortamında kültüre almışlardır. Çalışma sonunda, sürgünlerin 3 dakika süre ile 30 damla Tween-80 eklenmiş 677 mg/l HgCl₂ solüsyonunda bekletildiği ve ardından steril saf sudan geçirilerek 15 dakika %50 chlorox ile muamele edildiği yöntemin en uygun sterilizasyon yöntemi olduğu rapor edilmiştir. Meristem uçlarından kallus ve sürgün rejenerasyonu gözlemlendiği belirtilmiş ancak bu çalışmanın sadece meristem kültürleri için sterilizasyon protokolünü oturtmak amacıyla yapıldığı ifade edilerek rejenerasyon oranları hakkında bir bilgi verilmemiştir. Fenolik bileşikler açısından zengin oldukları bilinen olgun hücrelerin meristem ile birlikte alınmasının hızlı kararmaya ve akabinde eksplantlarda ölüme yol açtığı, çok küçük boyutlarda alınan meristemlerin ise bitkiye dönüşme oranlarının çok az olduğu veya hiç olmadığı ve bu yüzden alınan meristemin boyutunun önemli olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda 0.3-0.5 mm boyutlarında eksplantlar kullanılmıştır. Boyutları çok küçük olduğundan rejenerasyonun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Ayrıca, Rugini and Gutiérrez-Pesce (2006)'nin ifade ettiği gibi zeytin bitkisinde *in vitro* koşullarda büyüyen sürgünlerden meristem almak daha uygun olabilir. *In vitro* koşullara alışmış kültürlerde artık kararma riski de azaldığından bu kültürlerden alınan meristemlerden sürgün rejenerasyonu başarılabilir.

Çalışmalar süresince Domat çeşidinde oldukça ciddi kararma problemi ile karşılaşmıştır. Bu nedenle bu çeşitte ayrıca kararma için çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Yapılan ilk uygulamalarda özellikle sterilizasyon sırasında kullanılan maddeler üzerinde durulmuştur. Sterilizasyon için kullanılan maddeler ve

uygulanma süreleri kararmayı önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bu amaçla Temmuz-Aralık 2011 döneminde yapılan çalışmalarda; %15'lik NaOCl solüsyonunun uygulanma süresi 15 dakikadan 10 dakikaya indirilmiş; NaOCl yerine HgCl_2 , anolit gibi farklı sterilant maddeler kullanılmıştır. NaOCl sterilizasyon süresinin indirildiği uygulamada 1. haftada %66.67 olan kararma oranı 4. haftada 84.45'e kadar çıkmıştır. Sterilant madde olarak NaOCl yerine %0.1'lik HgCl_2 solüsyonunun kullanıldığı uygulamalarda hem 5 dakikalık hem de 10 dakikalık sterilizasyon süresinde ilk hafta eksplantların tamamı kararmıştır. Başka bir uygulamada sterilant madde olarak Anolit kullanılmıştır. Anolit süperoksitlenmiş (elektronize) su olarak ifade edilmektedir. Tuzlu suya elektrik akımı (950 mV) uygulanarak elde edilen elektrolize su mikroorganizmalara karşı geniş bir etki spektrumu göstermesinden dolayı dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Elektrodla voltaj uygulandığında iyonlar yüklerine göre ayrılırlar ve bunun sonucu anot bölgesinde asidik (pH 2.3-4) çözelti (anolit), katot bölgesinde ise alkali (pH 9-13) çözelti (katolit) oluşur. Anolit, içerisindeki maddelere (hipokloroz asit, hipoklorit iyonları, erimiş halde oksijen, ozon, süper oksit radikalleri) bağlı olarak güçlü oksidasyon potansiyeli ve yüksek derece antimikrobik aktivite gösterir. Bakteri, virüs, fungus ve parazitleri hızlı bir şekilde öldürür. Sporlara etkisi ise yavaştır. Toksik bir ürün oluşturmamaktadır ve aktif maddeler kısa ömürlü oldukları için durulama gerekmemektedir (Samastı, 2008). Anolit kullanılarak yapılan uygulamalarda eksplantlar Anolit çözeltisinde 30 dakika veya 60 dakika süreyle steril edilmiş ve steril saf su ile durulanmadan kültüre alınmışlardır. Bu uygulamalarda 1. haftada kararan eksplant oranları sırasıyla %53.33 ve 71.11 iken 4. haftada hepsi kararmıştır. Bir diğer uygulamada eksplantlar sterilizasyondan sonra 3 saat süre ile steril su içerisinde bekletildikten sonra kültüre alınarak bir hafta süreyle sürekli karanlıkta muhafaza edilmişler ve daha sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoda alınmışlardır (Seyhan ve Özzambak, 1994). Bu uygulamada 1. haftada %82.22 olan kararma oranı 4. haftada %100'e çıkmıştır. Seyhan ve Özzambak (1994) Domat ve Memecik çeşitlerinde yaptıkları çalışmada sterilizasyondan sonra nodal eksplantları 3 saat steril saf suda beklettiklerini ve bu uygulamanın kararmayı önlediğini ifade etmişlerdir. Ancak yaptığımız çalışmada aynı sonuca ulaşamadık. Bunun nedeni kullanılan donör bitkilerin ya da donör bitkinin içerdiği fenolik madde miktarlarının farklı olması olabilir.

Antioksidanlar, yüksek stokiyometrik etkinlikli, kararlı substratların oksidasyonunu inhibe eden elektron vericisidirler. Antioksidanlar, çoğunlukla redoks potansiyelini düşüren indirgeyici ajanlar olarak rol oynarlar ve izole edilmiş bitki dokularının ya da ekstraktlarının kararmasını önlemede etkindirler. Askorbik asit ve sitrik asit, bitki doku kültürlerinde en çok kullanılan antioksidanlardır. Kararma prosesini geciktirmek amacıyla, eksplantlar askorbik asit ve sitrik asit solüsyonlarında çalkalanabilirler (Sathyanarayana ve Varghese, 2007). Çalışmamızda eksplantlar sterilizasyondan önce 100 mg/l askorbik asitte 2 saat süre ile bekletilmiş, sterilizasyondan sonra kültüre alınan nodlar öncelikle 7 gün sürekli karanlıkta muhafaza ettikten sonra 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoda alınmıştır. Bu uygulamada 1. haftada %73.33 olan kararma oranı 4. haftada %100 olmuştur. Sterilizasyon öncesi antioksidan uygulaması kararma üzerine etkili olmamıştır.

Domat çeşidinde kararmaya yönelik çalışmalara Haziran 2012 Döneminde devam edilmiştir. Yapılan uygulamaların birinde kültüre alınan eksplantlar 1 hafta süre ile +4°C'de karanlıkta muhafaza edildikten sonra kültür odasına aktarılmışlardır. Uygulamanın ilk 2 haftasında kararma oranı oldukça düşük (%2.22) olmuş fakat 4. haftada 86.67'ye kadar çıkmıştır. Besin ortamının pH'sının 5.0'a ayarlandığı uygulamada 1. hafta kararma oranı %37.78, 4. hafta %100 olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada soğuk uygulaması farklı bir şekilde yapılmış ve eksplantların sterilizasyonundan sonra durulama için +4 °C'de steril saf su kullanılmıştır. İlk haftada kararma oranı %42.22, 4. haftada ise %100 bulunmuştur.

Antioksidanlar, aynı zamanda, besin ortamının aşırı kararmasını azaltmak için de doku kültürü ortamına eklenirler. Ancak askorbik asit, ısı ile bozulmaktadır ve bu yüzden filtre sterilizasyonu yapılarak ortama ilave edilmelidir ve otoklavlanmamalıdır. Sitrik asit de besin ortamına eklenebilmektedir, ancak kararmanın önlenmesinden başka amaçlar için de kullanılmaktadır ve hem bir tampon, hem de bir besin olarak rol oynayabilmektedir (Sathyanarayana ve Varghese, 2007). Besin ortamına sitrik asit ve askorbik asidin her birinden genellikle 100 mg/L ilave edilmektedir. Ayrıca, ortama polivinilpirolidon (PVP) (250-1000 mg/L) eklemek de fenollerin

oksidasyonunu önleyebilmektedir (Chawla, 2002). Kararmanın önlenmesi için yapılan antioksidan denemesinde 100 mg/l Askorbik asit + 150 mg/l Sitrik asit pH'sı 5,7'ye ayarlanıp filtre sterilizasyonundan geçirilerek besin ortamına eklenmişlerdir. İlk hafta karar oranı %57.78 iken 4. haftada eksplantların hepsi kararmıştır. Besin ortamında antioksidan kullanımı da eksplantların hayatta kalması için yeterli olmamıştır. Bir diğer antioksidan denemesinde sterilizasyondan önce tek nodlu eksplantlar, 100 mg/l Askorbik asit + 150 mg/l Sitrik asit içeren çözeltide 1 saat süre ile, sterilizasyondan sonra ise steril saf su içerisine filtre sterilizasyonu ile eklenmiş yine aynı konsantrasyonlardaki Askorbik asit + Sitrik asit çözeltisinde 3 saat süre ile bekletildikten sonra kültür tüplerine aktararak kültür odasında muhafaza edilmişlerdir. Sterilizasyon sonunda uygulanan antioksidanların bitkilerin gelişimi üzerine hiçbir etkisi bulunmadığı ancak eksplantların kararmasını önleyebileceği veya geciktirebileceği rapor edilmiştir (Khan et al., 2002). Rostami and Shahsavar (2012) Mission çeşidinde dokuz yıllık ağaçlardan aldıkları 50 mm uzunluğundaki gövde parçalarını yaprakları kesildikten sonra 30 dakika akan suyun altında yıkamışlardır. Fenolik bileşiklerin sentezlenmesini ve kararmayı önlemek için, eksplantlar 2 saat süre ile suda bekletildikten sonra, 1:1 oranında askorbik asit: sitrik asit çözeltisine (0, 50+50, ve 100+100 mg/l) 30 dakika daldırılmışlardır. Sürgünlerin öncelikle suda ve daha sonra askorbik asit ve sitrik asit karışımında bekletilmesi fenolik madde oluşumunu azaltmış ve eksplantların nekrozise uğramasını önemli ölçüde önlemiştir. Ancak başka bir çalışmada Khan et al. (2002) tarafından, sterilizasyon sonunda eksplantların askorbik asit ve sitrik asit ile muamele edilmesinin eksplantlarda kararmayı önlemediği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda eksplantların sterilizasyondan önce ve sonra antioksidanlarla muamele edilmesi sonucunda 1. haftada karar oranı %62.22, 4. haftada %95.55 olmuştur. PVP ile yapılan uygulamalarda besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0 ve 5.0 g/l) eklenerek karar üzerine etkili olup olmadığı araştırılmıştır. İlk haftada karar yüzdeleri sırası ile %42.22, %13.33 ve %24.45 iken 4. haftada eksplantların hepsi kararmıştır.

Aktif karbon, karbonun amorf (biçimlenmemiş) bir formudur. Amorf karbon, yüksek yüzey alanı ve porsu bir yapıdan oluşmaktadır. Onun bu doğal kimyası sayesinde, besin ortamından birçok organik ve anorganik molekül kolay bir şekilde absorblanabilmektedir ve bu durum aktif karbonun kullanıldığı besin ortamını ideal kılmaktadır. Aktif karbon, agardan toksik kontaminantları ve kültür sistemleri tarafından salgılanan sekonder ürünleri uzaklaştırabilmektedir. Böylece, eksplantların kararması önlenabilmektedir. Özellikle köklendirme ortamlarında kullanımı faydalı olabilmektedir. Ancak, aktif karbon sadece toksik bileşikler değil, aynı zamanda besin ortamında bulunan büyüme düzenleyicileri ve diğer bileşikler de absorbe edebilmektedir (Sathyanarayana ve Varghese, 2007). Bu nedenle, besin ortamı içinde kullanılan miktarına dikkat edilmelidir. *In vitro* büyüyen kültürlerde bir problem teşkil eden fenolik bileşikler için besin ortamına % 0.2-3.0 (w/v) konsantrasyonlarında aktif karbon ilave edilmektedir (Chawla, 2002). Çalışmamızda aktif karbon besin ortamlarına 0.5, 1.0 ve 2.0 g/l miktarlarında eklenerek kararmaya etkileri araştırılmıştır. Ancak bu uygulamada da 1. haftada düşük olan kararma oranları (sırasıyla %17.78, 22.22 ve 8.89) 4. haftada neredeyse eksplantların hepsi kararmıştır.

Temmuz-Aralık 2012 döneminde yapılan kararma problemini çözmeye yönelik çalışmalardan birinde oksidasyonu engellemek için eksplantlar zeytinyağı ile kaplanmış ve bu şekilde kültüre alınmıştır. İlk haftadaki %35.55 kararma oranı 4. haftada %100 olmuştur. Başka bir uygulamada sterilizasyondan sonra eksplantlar pH'sı 7.0'a ayarlanmış steril saf su ile durulanmışlardır. Nötr pH'nın eksplantlara zarar vermeyeceği düşünülmüş ancak birinci haftada %15.55 olan kararma oranı 4. haftada %97.78'e ulaşmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra eksplantların 3 yerine 6 defa steril saf sudan geçirildiği uygulamada çok etkili olmamış ve 1. hafta ve 4. hafta kararma oranları sırasıyla %22.22 ve %100 olarak hesaplanmıştır.

Domat çeşidinde kararmanın çözümüne yönelik yapılan ve yukarıda bahsedilen uygulamaların hepsinde yüksek kararma oranlarından dolayı sürgün rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Ancak eksplantların tek nod yerine 2 ve 3 nod içerecek şekilde kültüre alındığı uygulamalar, fidandan kesilen sürgünlerin yaprakları uzaklaştırıldıktan sonra nodlarına parçalanmadan bütün halinde steril

edildiği ve daha sonra bisturi yardımı ile tek nod içerecek şekilde kesildiği uygulama ve geçici daldırma sistemi ile çalışan RITA biyoreaktörlerinde kültüre alınan eksplantlarda kararma oranları %50'nin üzerinde olmasına rağmen sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Zeytin güçlü *in vitro* apikal dominansi ile karakterize edilmektedir ve bu özellik zeytinin mikroçoğaltımını sınırlandırmaktadır (Rugini and Panelli 1993a; Rugini and Panelli 1993b). Domat çeşidinde sürgün rejenerasyonu 2 hafta sonunda gerçekleşmektedir. Bu durum dominansinin 2 haftada ancak kırıldığını göstermektedir. Domat çeşidinde daha bu periyot atlatılmadan 1. haftada kararma tomurcuklara kadar ilerlediği için sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemektedir. Ancak yapılan uygulamada olduğu gibi eksplant boyutu 2-3 nod içerecek şekilde büyük alındığında eksplantta başlayan kararma tomurcuğa ulaşmadan dominansi kırılmakta ve sürgün rejenerasyonu gerçekleşmektedir diye düşünülebilir. İki nodlu alınan eksplantlarda kararma oranı %71.48, rejenerasyon oranı %42.22 ve eksplant başına sürgün sayısı 0.58 adet bulunmuştur. Üç nodlu kültüre alınan eksplantlarda ise kararma oranı %66.67, rejenerasyon oranı %53.33 ve eksplant başına sürgün sayısı 0.69 adet olmuştur. Bitkisel materyallerin bütün halinde steril edilip sterilizasyondan sonra tek nod içerecek şekilde kesilip kültüre alındığı uygulamada ise kararma oranı %62.22, sürgün rejenerasyon oranı %48.89 ve eksplant başına sürgün sayısı ise 0.93 adet olarak hesaplanmıştır.

Kültüre alınan eksplantların besin ortamı solüsyonu ile belirli periyotlarla ıslatıldığı ve böylece geriye kalan periyotta bitki dokularına hava girişinin sağlandığı metot geçici daldırma sistemi olarak tanımlanmaktadır (Afreen, 2006). Geçici daldırma sistemine göre çalışan RITA® (Réipient à Immersion Temporaire Automatique) biyoreaktörünün hacmi 1 l'dir ve tekrar kullanılabilir ve otoklavlanabilir bir plastik olan polisülfondan yapılmıştır. Biyoreaktör 2 bölmeden oluşmaktadır. Biyoreaktörün üst bölmesine eksplantlar, alt bölmesine ise sıvı besin ortamı yerleştirilmektedir. Bu iki bölme, alt bölmeye basınç uygulandığında besin ortamı yukarı çıkacak şekilde birbirine bağlanmıştır (Teisson ve Alvard, 1999). RITA® biyoreaktörlerinde yapılan uygulamada muhtemelen kullanılan sıvı kültürden ve ortamın sürekli havalandırılmasından dolayı eksplantların kararmaları gecikmiş ve bu şekilde eksplantların dominansi

periyodunu atlatarak sürgün rejenerasyonunu sağladığı düşünülebilir. RITA® biyoreaktörlerinde kültüre alınan domat eksplantlarında kararma oranı %60.00 olmasına rağmen, %60.00 oranında bitki rejenerasyonu ve eksplant başına 1.09 adet sürgün elde edilmiştir. Ancak tüm sürgünlerde vitrifikasyon gözlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Bahçedeki ağaçlardan alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, dış koşullarda yetişen ağaçların kontaminasyona sebep olan bakteri, fungus ya da böcek gibi organizmalara tamamen açık olduklarından *in vitro* çalışmalarda sterilizasyon prosedürünün oturtulmasının oldukça güç olduğu anlaşılmaktadır. Dış koşullarda bulunan ağaçlardan alınan bitkisel materyaller için oldukça ağır sterilizasyon prosedürleri uygulamak gerekmektedir, fakat uygulanan bu ağır sterilizasyon zeytin bitkisinin *in vitro* çoğaltımında en önemli problemlerden biri olan kararma sorununu da ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca ağaçlardan alınan materyaller başta dışsal kontaminantlardan arındırılırsalar bile mikroçoğaltımın ileriki aşamalarında içsel kontaminasyonla karşılaşma riski de oldukça yüksektir. Bu içsel kontaminasyonları elemine etmek için besin ortamlarına birkaç altkültür boyunca antibiyotik, fungusit, PPM gibi mikroorganizmaların gelişmesini engelleyici ve tamamen elemine edici kimyasalların eklenmesi gerekebilir. Ancak bu maddeler, sadece mikroorganizmaların gelişmesine etkide bulunmazlar, aynı zamanda bitkisel materyalin büyümesini de yavaşlatırlar. Bu ise istenmeyen bir durumdur. Doğada, diğer bir ifade ile bahçelerde yetişen ağaçlardan yılın belirli dönemlerinde, özellikle de vejetatif büyümenin aktif olduğu bahar aylarında eksplantlar alınmaktadır. Bu dönemler dışında alınan materyallerde sürgünler dormant halde bulunmalarından dolayı, *in vitro* rejenerasyon oranı da azalmakta, hatta hiç rejenerasyon gerçekleşmemektedir.

Yukarıda sözü edilen tüm bu riskleri elemine etmek üzere *in vitro* çalışmalar için kullanılacak olan eksplantların ısı, ışık ve nem gibi faktörlerin tamamen kontrol altında tutulduğu seralarda yetişen fidanlardan alınması önemlidir. Ayrıca bu bitkisel materyallerin belirli periyotlarla ya da materyal alınmadan yaklaşık 1 hafta-10 gün önce yapraktan püskürtme ile fungusit uygulaması yapılarak *in vitro* çalışmalardaki sterilizasyon başarısının önemli ölçüde arttırılmasına çaba sarf edilebilir. Düzenli periyotlarla yapraktan yapılan püskürtme yolu ile fidanlara gübre verilerek ve seradaki fiziksel koşullar ayarlanarak fidanlar için istenilen vejetatif büyüme koşulları oluşturulabilir ve bu şekilde fidanlardan her dönemde eksplant alma imkanı arttırılabilir. Bu yüzden zeytin ile ilgili yapılan *in vitro*

çalışmalarda kullanılacak olan eksplantların serada kontrollü koşullar altında tutulan fidanlardan alınması önerilebilir.

Gemlik çeşidine ait fidanlar ile Domat çeşidine ait fidanlar aynı serada bulunmalarına rağmen, Gemlik çeşidinde %15'lik NaOCl ile 10dk sterilizasyon yeterli olmasına rağmen, Domat çeşidinde 24 saat fungusit ön uygulaması yapılması gerekmiştir. İki çeşidin aynı sterilizasyon uygulamalarına farklı tepkiler vermesinin nedeni fidanların serada bulundukları konumdan kaynaklanabilir. Gemlik fidanları seradaki bankolar üzerinde, Domat fidanları ise yine sera içerisinde fakat yerde toprak üzerinde muhafaza edilmeleri nedeniyle sterilizasyon uygulamalarına farklı cevaplar vermiş olabilirler. Ayrıca alışmamızda, sera koşulları çok iyi olmadığından fidanlarda zeytin güvesi konusunda sorunlar yaşanmıştır. Fidanlara uygulanan gübreler yeni sürgün teşvikini sağlamak açısından oldukça etkili olmuş, ancak oluşan bu yeni sürgünler aynı zamanda zeytin gvesini de cezbetmiştir. Bu durumda hem sterilizasyon sırasında başarılı olmak, hem de mevcut fidanları zeytin zararlılarından uzak tutmak için fidanların dış ortamdan tamamen izole oldukları ve fiziksel koşulları otomatik olarak ayarlanabilen donanımlı seralarda muhafaza edilmeleri faydalı olabilir. Ayrıca donör bitki olarak kullanılacak fidanlar seraya alınmadan önce anolit gibi sterilant maddeler ile muamele edilerek bir n sterilizasyon işleminin uygulanması da önerilebilir. Bunun dışında, ileride ortaya çıkabilecek zararlı bulaşmalarını önlemek için sağlıklı olduğuna iyice emin olunan fidanlar sera içine alınmalıdır.

Fidanlar ve ağaçlara ait nod eksplantlarına 24 saat fungusit n uygulaması sterilizasyon başarısını önemli ölçüde arttırmıştır, fakat tüm uygulamalarda eksplantların hepsi kararmıştır. Fungusit ile ilgili yapılan sterilizasyon uygulamalarında bitkilerden alınan sürgünler yapraklarından arındırıldıktan sonra, gövde tek nod içerecek şekilde parçalara ayrılmış ve nod eksplantları bu şekilde fungusit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletilmiştir. Uygulamanın bu şekilde yapılmış olması, kararmayı tetikleymiş olabileceğinden hareketle, bu uygulamayı yapmak yerine bitkilerden alınan sürgünler akan suyun altında iyice yıkandıktan sonra nod eksplantlarına ayrılmadan ve yaprakları kesilmeden dip kısımları fungusit içeren solüsyonda olacak şekilde 24 saat bekletilebilirler ve ayrıca st

kısımlarına püskürtme ile fungusit solüsyonu da uygulanabilir. Bunun dışında, yapraklarından arındırılan sürgünlerin gövdeleri, nod eksplantlarına parçalanmadan bütün halinde tamamen fungusit solüsyonuna batırılarak ya da üzeri nemli kalacak şekilde püskürtme yolu ile fungusit solüsyonu uygulanarak bekletilebilirler. Başka yapılabilecek bir uygulama ise nod eksplantlarının sterilizasyon işleminin ardından 3 defa steril saf sudan geçirildikten sonra otoklavda steril edilen fungusit solüsyonu ile muamele edilerek bu şekilde kültüre alınmaları olabilir. Ancak bu uygulamanın eksplantların sürgün verme potansiyellerini engelleyebileceği hususu dikkate alınmalıdır. Kullanılan fungusit miktarına ve etken maddesine de dikkat edilmelidir. Doku kültürü çalışmalarında genellikle benomyl içerikli fungusitler kullanılmakla birlikte, özellikle zeytin için kullanılan fungusitler de tercih edilebilir. Ayrıca fungusitin bulunduğu paketin üzerinde genellikle hangi bitki türleri için hangi miktarlarda kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Yapılan uygulamalarda bu miktarlar da dikkate alınabilir.

Ağaçlardan alınan nod eksplantlarına NaOCl'nin pH'nın 7.0'a ayarlanarak yapıldığı sterilizasyon uygulamalarında aynı zamanda fungusit de kullanıldığı için sterilizasyonda asıl etkili olanın fungusit olduğu düşünülmektedir. Yine ağaçlardan alınan nod eksplantlarının PPM eklenmiş besin ortamlarında kültüre alındığı uygulamalar Gemlik çeşidinde etkili olurken, Domat çeşidi için uygun bulunmamıştır. PMM'in ağaçlardan alınan eksplantlar yerine fidanlardan alınan eksplantlara uygulanması daha uygun olabilir. Ayrıca elde edilen sürgünlerde ileriki aşamalarda altkültürlerde çıkabilecek içsel kontaminasyonlara karşı da kullanılabilir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi, bitki gelişimini engelleyebileceği göz ardı edilmemelidir.

Başlangıçta sterilizasyon çalışmaları sırasında yoğun kontaminasyon problemi ile veya kültürün ileri aşamalarında içsel kontaminasyon ile karşılaşıldığında kontaminasyona sebep olan mikroorganizmanın teşhisi yapılarak sterilizasyon sırasında bu mikroorganizmaya spesifik olan sterilantlar kullanılabilir ya da bu maddeler, birkaç altkültür boyunca besin ortamına uygun miktarlarda ilave edilebilirler. Bu şekilde, kültürler kaybedilmeden mikroorganizmaların eliminasyonu sağlanmaya çalışılabilir.

Domat çeşidinde gözlenen kararma problemini çözmeye yönelik çalışmalarda fidanlardan alınan nod kültürlerinin sterilizasyonunda sterilant madde olarak 5 ve 10dk süreler ile HgCl_2 kullanılmış ve %100 steril eksplant elde edilmiştir. Ancak bu süreler eksplantların hepsinin kararmasına sebep olmuştur. Bu uygulamadan sonra süre azaltılarak 3dk'ya indirilmiş, Gemlik ve Domat çeşitlerine ait nod eksplantları %0.1'lik HgCl_2 ile 3dk süreyle steril edilmişlerdir. Domat çeşidinde sterilizasyon sırasında eksplantlarda kararma meydana gelmemiştir. Civa klorür Gemlik çeşidinde hem sterilizasyon sonrasında, hem de kültür sırasında kararmaya neden olmamıştır. Civa klorürün kullanılan diğer sterilant maddelere göre çok daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca eksplantlar HgCl_2 'e diğer sterilant maddelerden farklı olarak 3dk gibi kısa bir süre maruz bırakıldıkları için sterilizasyon sırasında kararma gözlenmemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak zeytin bitkisinde sterilizasyon için %0.1'lik HgCl_2 kullanımı önerilebilir. Uygulanacak süre ise yapılacak denemelerle belirlenmelidir. Çünkü bitkiyi muhafaza ettiğimiz koşullara ve çeşide göre süre değişebilir, ancak 5dk'yı geçmemesine özen gösterilmelidir. HgCl_2 çok kuvvetli bir sterilant olmasından dolayı daha yoğun konsantrasyonları eksplantları karartabilir ve ayrıca oldukça toksik olduğu için kullanımı sırasında çok dikkat edilmelidir. Toz halinde bulunmaktadır ve solüsyon mutlaka çeker ocakta eldiven, maske takılarak hazırlanmalıdır. Laminer hava akışlı kabinde çalışırken de yine eldiven ve maske kullanılmalıdır. Ayrıca HgCl_2 konulan beher, şişe gibi malzemeler yine eldivenle akan suyun altında iyice durulanmalıdır. Mümkünse kullanılan ortamda havalandırılmalıdır.

Sterilizasyon aşamasının başlangıcında eksplantlar kısa bir süre etil alkole batırılmaktadır. Ancak bu işlem zeytin bitkisinde kararmayı arttırabilmektedir. *In vitro* kültürlerin kurulmasında ilk aşama olan sterilizasyon prosedürü oluşturulurken mutlaka başlangıçta etil alkol kullanılmayan bir prosedür de denenmeli ve uygun miktarda steril materyal elde edilebiliyorsa etil alkol sterilizasyon prosedüründen çıkarılmalıdır. Bunun dışında eksplantlar etil alkole batırıldıktan sonra bir defa steril sudan geçirilip daha sonra sterilant madde ile muamele edilirse yine etil alkolün eksplantlara verdiği zarar azaltılabilir.

Zeytin ile ilgili doku kültürü çalışmalarında genellikle Rugini (1984) tarafından zeytin için geliştirilen besin ortamı ve bunun modifikasyonları kullanılmaktadır. Ancak zeytinde her çeşidin *in vitro* koşullara tepkisi farklı olduğundan çalışmaya başlandığında ilk önce kullanılan çeşit için en uygun temel besin ortamının bulunması gerekmektedir. Yapılan çalışmada Gemlik çeşidinde en iyi temel besin ortamının WPM olduğu belirlenmiştir. Çalışacağımız çeşit için optimum temel besin ortamını belirlerken bu çeşidin yetiştiği alandaki toprak analizlerinden veya bitkiden alınan yaprak analizlerinden faydalanabiliriz. Bitkinin topraktan en fazla kaldırdığı elementler veya yaprakta bulunan mineral maddeler ve miktarları belirlenerek besin ortamları bu sonuçlara göre modifiye edilerek kullanılabilir. Gemlik çeşidinde ortamda KNO_3 miktarının arttırılması sürgün uzamasını sağlamıştır.

Meristem kültürü çalışmalarında fidanların aktif büyüme zamanında olduğu yeni sürgünler kullanılmıştır. Ancak yapılan tüm uygulamalar sonucunda kararma meydana gelmiştir. Başlangıç materyalini doğrudan fidanlardan almak yerine mümkünse *in vitro* koşullarda çoğaltılmış sürgünlerden almak daha uygun olabilir. Altkültürler ile *in vitro* koşullara alıştırılan sürgünlerden meristemler alındığında kararma önlenabilir ya da daha az olabilir ve rejenerasyon sağlanabilir. Ayrıca *in vitro* sürgünler, fidanlara göre daha genç olduklarından ve hepsi aynı fizyolojik koşullar altında muhafaza edildiklerinden rejenerasyon elde etme oranı yüksek olabilir.

Çalışılacak olan zeytin çeşidinin vejetatif büyümenin aktif olduğu zamanlardan örnekler alınarak fenolik bileşiklerin en az sentezlendiği dönem seçilebilir ve bu dönemde bitkisel materyaller kültüre alınabilir. Böylece zeytinde karşılaşılan kararma problemi azaltılabilir ve rejenerasyon için başarı oranı arttırılabilir. Ya da farklı mevsimlerde eksplantlar alınarak kültüre alınan eksplantlarda kararma oranları belirlenebilir ve buradan elde edilen sonuçlara göre başlangıç materyali olarak kararmanın en az gözlemlendiği mevsimde alınan eksplantlar kullanılabilir.

Yapılan çalışmalarda Gemlik çeşidinde hem sterilizasyon aşamasında, hem de daha sonraki aşamalarda odunsu dokusu oluşmaya başlamış veya tam odunsulaşmış eksplantlarda kararma olayı daha fazla olmuştur. Bu yüzden, bu çeşitle yapılacak olan çalışmalarda henüz odunsu dokusu oluşmamış olan yeni sürgünlerden eksplant alınması daha uygundur. Domat çeşidinde ise eksplant alırken aksiler tomurcuklara dikkat etmek gerekir. Domat çeşidine ait tomurcuklar çoğu zaman esmer durumda oldukları için bu halde alınan tomurcuklarda kararma çok olmaktadır. Bu nedenle tomurcukların yeşil olduğu, büyümenin aktif olduğu ve odunsu dokunun henüz oluşmadığı yeni sürgünlerden eksplant alınması başarıyı arttırabilir.

Dış koşulların (ışık, sıcaklık, nem gibi) değişken olmasından, bitkilerin bulundukları konumdan veya hastalık taşıması gibi sebeplerden dolayı serada yetişen ya da bahçede bulunan zeytin bitkilerinin fizyolojik durumları birbirinden farklı olmaktadır. Bu durum, çalışmada oluşturulan *in vitro* kültürlerde fidandan fidana farklı rejenerasyon oranlarının veya kararma oranlarının elde edilmesine sebep olmuştur. Bu nedenle bir ön deneme ile rejenerasyona en iyi tepki veren ve daha az kararma gösteren fidanlar seçilerek başarı oranı arttırılabilir.

Yapılan nod kültürü çalışmalarından fidanların fizyolojik durumlarının yanı sıra, yaşlarının da sürgün rejenerasyonunu etkilediği gözlenmiştir. Çalışmanın bir kısmında nod kültürleri için Zeytincilik Araştırma İstasyonu'na ait seradaki 5 yıllık Gemlik fidanlarından alınan nod eksplantları, diğer bir kısım nod kültürü çalışmalarında ise 2 yıllık Gemlik fidanlarından alınan nod eksplantları kullanılmıştır. Beş yıllık fidanlardan alınan nod eksplantlarından gelişen sürgünlerin iki yıllık fidanlara göre çok daha iyi geliştikleri gözlenmiştir. Bu nedenle kullanılacak olan donör bitkinin yaşına da dikkat edilmelidir.

Gemlik çeşidinde ikinci grup fidanlardan oluşturulmuş nod kültürlerinden gelişen sürgünlerde yoğun vitrifikasyon ile karşılaşmıştır. Ancak çalışmada ilk dönem yapılan nod kültürü uygulamalarında vitrifikasyon gözlenmemiştir. Yapılan bu her iki uygulamada fizyolojik koşullar değişmezken, sadece besin ortamında kullanılan agar çeşidi farklı olmuştur. Bu nedenle vitrifikasyonun kullanılan agar tipinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Zeytin bitkisinde

yapılan *in vitro* çalışmalarda bu durum göz önünde bulundurulabilir ve vitrifikasyon sorunu ile karşılaşıldığında besin ortamı içerikleri detaylı ele alınabilir.

Gemlik çeşidinde nod kültürlerinden gelişen bazı sürgünlerin aynı besin ortamı içeriğinde rejenere olmalarına rağmen farklı morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir. Zeytin bitkisinde yapılan sürgün rejenerasyonu çalışmalarında bu durum ile karşılaşıldığında kullanılan fidanların moleküler biyolojik analizleri yapılarak fidanlar arasında klon farklılıkları olup olmadığı belirlenerek mevcut durumun kullanılan fidanlardan mı, yoksa *in vitro* koşullardan mı kaynaklandığı belirlenebilir.

Domat çeşidinde kararmayı önlemeye yönelik yapılan uygulamalarda PVP, askorbik asit, sitrik asit, aktif karbon gibi bileşikler kullanılmış, ancak bunların kararmayı azaltmadığı gözlenmiştir. Yoğun fenolik madde içeren bazı bitkiler *in vitro* kültürlerde fenoliklerini besin ortamına salgılamaktadır. Yukarıda bahsedilen bileşikler, bu fenolikleri kendilerine bağlayarak ya da oksidasyonu engelleyerek kararmayı önlemektedirler. Zeytin bitkisinde kararma ise daha farklı gözlenmiştir. Zeytinde eksplant ortama fenolik salgılamamakta, tersine sadece kendini karartmaktadır. Bu nedenle bu maddeler etkili olmamış olabilir. Böyle maddeler yerine kararmanın fizyolojik mekanizmasına doğrudan etki ederek kararmayı engelleyecek kimyasallar ile uygulama yapılması önerilebilir.

Domat çeşidinde kararma önce dış dokulardan başlamakta, gövde dış yüzeyi ve yanal tomurcukların dış yaprakları kararmaktadır. İki hafta sonunda sürgün vermeyip kararan bazı eksplantların dış kabukları soyulduğunda iç dokuların yeşil olduğu ve yanal tomurcukların stereomikroskop altında dış yaprakları kesildiğinde de meristeme yakın kısımların yeşil olduğu gözlenmiştir. Bu durum, zeytinde bulunan güçlü apikal dominansıyı akla getirmektedir. Dominansinin kırılıp nod eksplantından sürgün rejenerasyonunun oluşması Gemlik çeşidinde 10-14 günde, Domat çeşidinde ise 14-21 günde meydana gelmektedir. Eksplantların kesilmesi ile birlikte bitki savunma mekanizması kararma için etkinleşebilir. Nod eksplantları, sürgün uçları kesildiğinde apikal dominansi baskısından kurtulurlar, ancak Domat çeşidinde tek nodlu eksplantlar kültüre alındığında dominansi kırılıp

sürgün rejenerasyonu gerçekleşene kadar kararmanın bu bölgelere ulaşabileceği ve sürgün rejenerasyonunu engelleyebileceği ifade edilebilir. Nitekim çalışmamızda 2 ve 3 nodlu olarak kültüre alınan eksplantlarda kararma oranı azaltılarak sürgün rejenerasyonu başarılmıştır. Bu nedenle, kararmanın baskın olduğu çeşitler için çok nodlu eksplantlar kültüre alınarak sürgün rejenerasyonunun sağlanmasına çalışılabilir. Ayrıca köklenmeler üzerinde de durularak, zeytin için uygun bir klonal çoğaltım prosedürünün oturtulmasına yönelik besin ortamları ve kültür koşullarının detaylı ele alındığı araştırmalara da büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Zeytin bitkisinde *in vitro* çalışmalarda rekalsitransi oldukça önemli bir sorundur. Sürgün elde etmek için oldukça büyük emekler sarf edilmektedir. *In vitro* koşullarda üretilen zeytin bitkicikleri dış koşullara aktarılıp sonraki aşamaları takip edilerek, klasik üretim metotları ile çoğaltılan fidanlar ile verim ve kalite açısından gerekli karşılaştırmaların yapılması yerinde olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A.,** 2004, Biyoteknolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri, E.Ü. Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi No:2.
- Afreen, F.,** 2006, Temporary Immersion Bioreactor: Engineering considerations and applications in plant micropropagation, Plant Tissue Culture Engineering, (Ed) Gupta, S.D., Ibaraki, Y., Springer, The Netherlands, 187-201.
- Ali, A., Ahmad, T. and Abbasi, N.A.,** 2009, Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar Moraiolo, Pak. J. Bot., 41(2): 783-795.
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Chatzissavvidis, C., Therios, I. and Papadakis, I.,** 2006, Effect of BA and GA₃ on the micropropagation and vitrification of olive (*Olea europaea* L.) explants (cv. Chondrolia Chalkidikis), Olivebioteq, November 5th-10th, 477-480p, Manzara del Vallo, Marsala/Italy.
- Bhatt, I.D. and Dhar, U.,** 2004, Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya, African Journal of Biotechnology, 3(10): 534-540.
- Binet, M.N., Lemoine, M.C., Martin, C., Chambon, C. and Gianinazzi, S.,** 2007, Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment, *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43:473–478.
- Briccoli Bati, C., Godino, G., Monardo, D. and Nuzzo, V.,** 2006, Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars ‘Carolea’ and ‘Nocellara Etnea’, *Scientia Horticulturae*, 109: 173–182.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brito, G. and Santos, C.,** 2009, Basal Medium Improvement for Routine Micropropagation of *Olea maderensis*: Physiological Comparative Studies, Can. J. For. Res., 39: 814-822.
- Bürün B.,** 2002, Hastalıksız Bitki Üretimi, 190-210s, Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (Ed), Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Cañas, L.A. and Benbadis, A.,** 1988, *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.), Plant Science, 54: 65-74.
- Canözer, Ö.,** 1991, T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Standard Zeytin Çeşitleri Kataloğu, 44–46., Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Teklif eden Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, M. Hadi Gökçe (Ed), Yayın Dairesi Başkanlığı, Mesleki Yayınlar Serisi NO Genel:334, Seri: 16, Ankara.
- Cerezo, S., Mercado, J.A. and Pliego-Alfaro, F.,** 2011, An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive, Plant Cell Tiss Organ Cult, 106:337-344.
- Chaari, A., Chelly Chaabouni, Maalej, M. and Drira, N.,** 2002, Meski olive variety propagated by tissue culture, 871-874, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.
- Chaari Rkhis, A., Maalej, M. and Drira, N.,** 2011, Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. ‘Oueslati’, Turk J Agric For, 35: 403-412.
- Chawla, H.S.,** 2002, Introduction to Plant Biotechnology, Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Compton, M.E. and Koch, J.M.**, 2001, Influence of plant preservative mixture (PPM)TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 37: 259-261.
- Çördük, N. and Akı, C.**, 2011, Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* bornm., an endemic medicinal herb of Turkey, Romanian Biotechnological Letters, 16 (6): 6760-6765.
- D'Amato, F.**, 1977, Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 343-357. Reinert J. and Bajaj, Y.P.S. (Eds) Narosa Publ. House, New Delhi.
- Doğu Akdeniz Zeytin Birliği**, Zeytin Dosyası “Zeytinciliğin Bugünkü Durumu ve Öneriler”, http://www.akdenizbirlik.org.tr/uls/zeytin_dosyasi.pdf (Erişim Tarihi: 28.12.12).
- Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H.**, 1984, *In vitro* propagation of Paradox walnut Rootstock (*Juglans hindsii* X *Juglans regia*, tissue culture). Hort. Sci., 19 (4): 507-506.
- Emiroğlu, Ü. ve Gürel, A.**, 2005, Bitki Islahında Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı, Tohum Bilimi ve Teknolojisi, Cilt 1, Sayfa 91-155. E. Ü. Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bornova, İzmir.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2012**, Food and Agricultural commodities production, Top production-Olives-2011, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Erişim Tarihi: 28 Aralık 2012).
- García-Férriz, L., Ghorbel, L., Ybarra, M., Belaj, A. and Trujillo, I.**, 2002, Micropropagation from Adult Olive Trees, 879-882, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- García, J.L., Troncoso, J., Sarmiento, R. and Troncoso, A.,** 2002, Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 69, 95–100.
- George, E.F.,** 1993, *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology.* Exegetic Ltd. Edington, Wilts, England.
- Giorgio, V., Gallotta A., Camposeo, S., Roncasaglia, R. and Dradi, G.,** 2006, Advances in improving micropropagation of olive (*Olea europaea* var. *sativa* L.): preliminary results on 18 olive varieties belonging to Italian and Spanish germplasm, *Olivebioteq*, November 5th-10th, 441-444p, Volume I, Manzara del Vallo, Marsala/Italy.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. and Eleftheriou, E.P.,** 2002, *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar ‘Chondrolia Chalkidikis’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 47-54.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Tzoulis, T. and Eleftheriou, E.P.,** 2005, Experimental Use of a Novel Temporary Immersion System for Liquid Culture of Olive Microshoots, 263–274, *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, Hvoslef-Eide, A.K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Gupta, S.D. and Prasad, V.S.S.,** 2010, Shoot multiplication kinetics and hyperhydric status of regenerated shoots of gladiolus in agar-solidified and matrix-supported liquid cultures, *Plant Biotechnol Rep*, 4:85–94.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gürel, A., Varol, N., Hayta, Ş., Ünal, S., Çetin, Ö., Alper N. ve Özışık, S.,** 2006, Bazı Zeytin (*Olea europaea* L.) Çeşitlerinin *In Vitro* Koşullarda Rejenerasyonları ve Köklenmeleri Üzerine Araştırmalar. Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Sempozyumu ve Sergisi, Sayfa 181-190, 15-17 Eylül 2006/İzmir.
- Jafarkhani Kermani, M., Khosravi, P. and Kavand, S.,** 2010, Optimizing in vitro propagation of *Rosa persica*, Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1(1): 44-51.
- Kalenderoğlu, H.,** 2010, Gemlik Zeytin Çeşidinde Dal Eğme İle Birlikte Yapraktan Azot, Potasyum ve Magnezyum Uygulamalarının Meyve Verimi Ve Kalite Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri A.B.D., 62s (yayımlanmamış).
- Kaya, Ü.,** 2006, Zeytinde Üretim Metodları, 28-34, Zeytin Yetiştiriciliği, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:61, Emre Basımevi, İzmir, 137s.
- Khan, M.R., Raced, H. and Carwash, A.,** 2002, Development of aseptic protocols in olive (*Olea europa* L.) cv. Pantaloon, Asian Journal of Plant Sciences, 1: 220-221.
- Ko, W.H., Su, C.C., Chen, C.L. and Chao, C.P.,** 2009, Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid, Plant Cell Tiss Organ Cult, 96: 137-141.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kutlu, E. ve Şen, F.,** 2011, Farklı Hasat Zamanlarının Gemlik Zeytin (*Olea europea* L.) Çeşidinde Meyve ve Zeytinyağı Kalitesine Etkileri, Ege Univ. Ziraat Fak. Derg., 48 (2): 85-93s.
- Lambardi, M., Benelli, C., Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E.A. and Gumusel, F.,** 2006, A Novel Approach to Olive Micropropagation: the Temporary Immersion System. Olivebioteq- November 5th-10th, 319-326p, Volume I, Manzara del Vallo, Marsala/Italy.
- Leva, A.R., Petruccelli, R. and Bartolini, G.,** 1994, Mannitol “*in vitro*” culture of *Olea europaea* L. (cv. Maurino), Acta Hort. 356: 43-46.
- Leva, A.R., Petruccelli, R., Montagni, G. and Muleo, R.,** 2002, Field Performance of Micropropagated Olive Plants (cv. Maurino): Morphological and Molecular Features, 891-894, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.
- Leva, A., Cantos, M., Liñán, J., Troncoso, J., García, M. and Troncoso, A.,** 2006, Morphological aspects of the *in vitro* formation of cv. Manzanillo olive somatic embryos and plant obtaining, Olivebioteq, November 5th-10th, 445-448p, Manzara del Vallo, Marsala/Italy.
- Lloyd, G. and McCown, B.,** 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture, Int. Plant Prop. Soc. Comb. Proc. 30: 421–427.
- Lucchesini, M. and Vitagliano, C.,** 2002, *In vitro* Micro-Environments to Improve Growth of Olive Plantlets During the Rooting Phase, 895-897, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maalej, M., Drira, N., Chaari-Rkhis, A. and Trigui, A.,** 2002, Preliminary results of Somatic Embryogenesis from Young Zygotic Embryos of Olive Tree, 899-901, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.
- Marìn-Zamora, M., Garcìa-Fèrriz, L., Ghorbel, R., Ybarra, M. and Marì, A.,** 2002, Effects of Arbuscular Mycorrhizae Inoculation on Micropropagated Olive Plants, 899-901, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort. 586, ISHS.
- Mencuccini, M.,** 2003, Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars., Sci. Hort., 97: 129-139.
- Mendoza-de Gyves, E., Mira, F.R., Ruii, F. and Rugini, E.,** 2008, Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac, Plant Cell Tiss Organ Cult, 92:233-238.
- Mete, N. ve Çetin, Ö.,** 2006, Zeytinin Botanik Sınıflandırılması ve Bölgelere Göre Yerli Zeytin Çeşitlerimiz, 15-27, Zeytin Yetiştiriciliği, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:61, Emre Basımevi, İzmir, 137s.
- Murashige, T. and Skoog, F.,** 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant. 56: 473-497.
- Niedz, R.P. and Bausher, M.G.,** 2002, Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees, In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant, 38:468–471.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ozkaya, M.T., Lionakis, S.M. and Vasilakakis, M.D.,** 2003, Factors affecting the in vitro regeneration and the rooting of defoliated cuttings of the olive cultivars ‘Kalamon’ and ‘Koroneiki’, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 17/2003/2: 70-76.
- Özden, Y., Özudoğru, E.A., Kaya, E. and Akdemir, H.,** 2010, Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemleri (TIS) ile *in vitro* sürgün çoğaltımının iyileştirilmesi, *Zeytin Bilimi*, 1(1): 1-6.
- Özen, Y. ve Kaya, Ü.,** 2007, Domat Zeytin Çeşidinin Farklı Klon Anaçları Üzerindeki Aşı Tutma Oranı ve Vegetatif Gelişimi, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 44(2): 119-129.
- Özgen, S.S.,** 1999, İki Farklı Zeytin Çeşidinde *In Vitro*da Kallus Oluşmuna Etki Eden Faktörler Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 169s.
- Özkaya, M.T., Tunaloğlu, R., Eken, S., Ulaş, M., Tan, M., Danacı, A., İnan, N. ve Tibet, Ü.,** “Türkiye Zeytinciliğinin Sorunları ve Çözüm Önerileri”, http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/1e2ad6bf99300cd_ek.pdf (Erişim Tarihi: 30 Aralık 2012).
- Pasqualetto, P.L., Zimmerman, R.H. and Fordham, I.,** 1988, The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14 (1): 31-40.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenco, R., Cardoso, H. and Macedo, E.,** 2007, Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation, *Scientia Horticulturae*, 113: 1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Revilla, M., Pacheco, J., Casares, A. and Rodriguez, R.,** 1996, *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 32: 257-261.
- Romano, A. and Martins-Loução, M.A.,** 1992, Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* L.) : establishment problems, *Scientia gerundensis*, 18: 17-27.
- Rostami, A.A. and Shahsavar, A.R.,** 2012, *In Vitro* micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) ‘Mission’ by nodal segments, *J. Biol. Environ. Sci.*, 6(17): 155-159.
- Roussos, P.A. and Pontikis C.A.,** 2002, *In vitro* Propagation of Olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki, *Plant Growth Regulation*, 37: 295-304.
- Rugini, E.,** 1984, *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos, *Scient. Hort.*, 24: 123-134.
- Rugini, E., Bazzoffia, A. and Jacoboni, A.,** 1988, A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees, *Acta Horticulturae*, 227: 438-440.
- Rugini, E.,** 1990, *In vitro* culture of olive: an overview of the present scientific status, *Acta Hort.*, 286:93-96.
- Rugini, E., Jacoboni, A. and Luppino, M.,** 1993, Role of basal darkening and exogenous putrescine treatment on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species, *Sci. Hort.*, 53: 63-72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rugini, E. and Panelli, G.,** 1993a, Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short term genetic improvement, Agro-Food-Industry Hi-Tech, 4: 3-5.
- Rugini, E. and Pannelli, G.,** 1993b, Preliminary results on increasing fruit set in olive (*Olea europaea* L.) by chemical and mechanical treatments, Acta Hort., 329:209-220.
- Rugini, E.,** 1995, Somatic Embryogenesis in Olive (*Olea europaea* L.), 171-189, Protokol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S. M. and Gupta P.K. (Eds.), Springer, Netherlands, 590p.
- Rugini, E., Gutierrez-Pesce, P. and Sampinato, P.L.,** 1999, New perspective for biotechnologies in olive breedings: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation, Acta Hort., 474:107-110.
- Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R. and Altamura, M.M.,** 2005, Olive (*Olea europaea* L.), 345-360, Protokol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S. M. and Gupta P.K. (Eds.), Springer, Netherlands, 590p.
- Rugini, E. and Gutiérrez-Pesce, P.,** 2006, Genetic improvement of olive, Pomologia croatica, 12 (1): 43-74.
- Samastı, M.,** 2008, Hastanelerde dezenfeksiyon kullanım esasları, yapılan hatalar, Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, No: 60: 143-168.
- Santos, C.V., Brito, G., Pinto, G. and Fonseca, H.M.A.C.,** 2003, *In vitro* regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*, Scientia Horticulture, 97:83-87.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sathyanarayana, B.N. and Varghese, D.B.,** 2007. Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols, I.K. International Publishing, New Delhi, India.
- Seyhan, S. ve Özzambak, E.,** 1994, Shoot multiplication of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars, Acta Horticulturae, 356: 35-38.
- Sghir, S., Chatelet, P., Ouazzani, N., Dosba, F. and Belkoura, I.,** 2005, Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars, Hort. Science, 40(1): 193-196.
- Shimon, L.,** 1998, Zeytinin Biyolojisi ve Fizyolojisi, (Çev. E. Soyadı), Dünya Zeytin Ansiklopedisi, Sayfa 61-110, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi Yayını, Barselona, İspanya, 479s.
- Singha, S., Townsend, E.C. and Oberly, G.H.,** 1990, Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23(2):135-142
- Teisson, C. and Alvard, D.,** 1999, *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion, Potato Research, 42: 499-504.
- Tunahoglu, R.,** 2010, Türkiye zeytinciliğinde tarihsel ve ekonomik gelişmeler, Zeytin Bilimi, 1(1): 15-22.
- Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı,** 2012a, “Haber Bülteni (28/03/2012), Bitkisel Üretim İstatistikleri 2011, Sayı: 10780, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=10780> (Erişim Tarihi: 28 Aralık 2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı**, 2012b, “Haber Bülteni (04/12/2012), Bitkisel Üretim 2. Tahmini 2012, Sayı: 10950”, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=10950> (Erişim Tarihi: 28 Aralık 2012).
- Zacchini, M. and De Agazio, M.**, 2004, Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation, *Biologia Plantarum*, 48 (4): 589-592.
- Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü**, “Yerli Çeşitlerimiz Kataloğu”, <http://www.zae.gov.tr/index.php/bolumler/islah/yerli-cesitlerimiz.html> (Erişim Tarihi: 30.12.12.).
- Zuccherelli, G. and Zuccherelli, S.**, 2002, *In Vitro* Propagation of Fifty Olive Cultivars, 931-934, Proc. 4th IS on Olive Growing, Vitagliano C. and Martelli, G.P. (Eds), Acta Hort., 586, ISHS.
- Yadav, M.K., Gaur, A.K. and Garg, G.K.**, 2003, Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 153–156.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Ardahan’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli ilinin Gebze ilçesinde tamamladıktan sonra 1996 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2000 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyolog ünvanını aldı. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. Yüksek Lisan süresince özel bir bitki doku kültürü laboratuvarında çalıştı ve 2004 yılında “Üç Patates (*Solanum tuberosum* L.) Genotipinde, Boğumlu Çelik ve Yatırılmış Sürgünlerde Mikro Yumru Oluşumu Üzerine Araştırmalar” başlıklı Yüksek Lisans Tezi’ni tamamladı. 2007 yılında yine Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Doktora yapmaya başladı ve 2010 yılında Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’ne Arş. Gör. olarak atandı.